

# Pharmacokinetic and pharmacological study of SAK3, a novel therapeutic drug candidate for Alzheimer ' s Disease ( **アルツハイマー病治療薬候補 SAK3の作用機序と脳内動態に関する研究** )

著者	泉 久尚
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19199号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129254">http://hdl.handle.net/10097/00129254</a>

Pharmacokinetic and pharmacological study of SAK3, a  
novel therapeutic drug candidate for Alzheimer's Disease

(アルツハイマー病治療薬候補 SAK3 の  
作用機序と脳内動態に関する研究)

令和元年度

東北大学大学院 薬学研究科

生命薬科学専攻 薬理学分野

B6YD1014 泉久尚

## 目次

要旨-----	1
1. 緒言 -----	3
2. 実験方法 -----	8
3. 結果	
3.1. SAK3 は App ノックインマウスにおける認知機能障害を改善し A $\beta$ 沈着を抑制する -----	22
3.2. SAK3 は CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性化により NL-G-F マウスのスパイン異常と認知機能障害を改善する -----	41
3.3. WT マウスと NL-G-F マウスにおける SAK3- $d_{10}$ の体内動態検討 -----	58
4. 考察 -----	62
5. 結論 -----	73
謝辞 -----	75
引用文献 -----	76
発表論文リスト -----	97

## 要旨

アルツハイマー型認知症 (AD) は認知症において最も多い疾患であり、アミロイドベータ ( $A\beta$ ) 沈着と神経原線維変化を病理学的特徴とする進行性の神経変性疾患である。現在、AD の治療にはコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジルや NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンが使用されているが、それらは対症療法に過ぎず、AD の進行を抑止することはできない。そのため、AD の根治を目指した疾患修飾薬の開発が求められる。当研究室では AD の新たな治療薬候補化合物として T 型カルシウムチャネルの活性化薬である SAK3 を創製した。本研究では、SAK3 の投与が  $App^{NL-F/NL-F}$  ノックイン (NL-F) マウスに認められる認知機能障害を改善し、 $A\beta$  の沈着を抑制することを明らかにした。また、マイクロアレイ解析と RT-qPCR 法によって serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) の遺伝子発現の減少の回復が SAK3 の慢性投与による治療効果に関与することを示した。  $App^{NL-G-F/NL-G-F}$  ノックイン (NL-G-F) マウスを用いた検討では、SAK3 の慢性投与は CaMKII/Rpt6 シグナルの賦活化を介してプロテアソームの活性を増加させ、NL-G-F マウスに認められるスパイアの異常と認知機能障害を改善することを明らかにした。SAK3 によるプロテアソーム活性の上昇は  $A\beta$  沈着の抑制にも関与すると考えられる。次に、SAK3 の急性投与は NL-G-F マウスの海馬におけるアセチルコリン (ACh) の放出を増加させ、認知機能障害を改善することを示した。また、ドネペジルの急性投与ではこれらの改善効果が認められなかったことから、急性投与による認知機能改善作用はドネペジルよりも優れていることを示した。最後に、UPLC-MS/MS を用いて SAK3- $d_{10}$  の高感度定量系を確立し、野生型マウスと NL-G-F マウスにおける体内動態を明らかにしたことで、SAK3 が血液脳関門を通過して脳へと移行することを示した。

本研究では、新規 AD 治療薬としての SAK3 の作用機序を解明した。SAK3 は CaMKII/Rpt6 シグナルを介してプロテアソームを活性化し、A $\beta$  の沈着を抑制した。さらに、スパイン構造を改善することで AD 脳でのシナプス機能を改善した。したがって、SAK3 は疾患修飾治療薬として、新たな AD 治療候補薬であることを証明した。

## 1. 緒言

### 1.1. アルツハイマー病

アルツハイマー病 (AD) は認知症の主要な原因疾患であり、細胞外における老人斑の沈着及び細胞内における神経原線維変化を病理学特徴とする進行性の変性神経疾患である (Braak and Braak, 1991; Hardy and Selkoe, 2002)。AD 患者は中核症状である認知機能障害、その他周辺症状として攻撃性の増加、不眠、徘徊行動、うつ様症状など様々な臨床症状を呈する (Alzheimer's Association, 2017)。AD の患者数は人口高齢化とともに増加の一途を辿っており、社会的及び患者家族の負担の増大が懸念されている (Kalaria et al., 2008)。現在、AD の治療にはコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジルや NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンが使用されているが、それらは対症療法に過ぎず、AD の進行自体を抑制することはできない (Panza et al., 2019)。そのため、A $\beta$  やタウタンパク質などを標的とした新たな疾患修飾薬の開発が続けられている (Huang and Mucke, 2012)。

### 1.2. T-型カルシウムチャネルを標的とした AD 治療戦略

T-型カルシウムチャネル (T-VGCCs) は低閾値で活性化し、一過性に開口するカルシウムチャネルであり、Cav3.1、Cav3.2、Cav3.3 の3つのアイソフォームが存在する (Blesneac et al., 2015; Powell et al., 2014)。T-VGCCs は脳内において広く発現しており、睡眠リズム、疼痛、てんかんなどの疾患に重要な役割を担っている (Altier and Zamponi, 2004; McCormick and Bal, 1997; Nelson et al., 2006; Shin et al., 2008; Zamponi et al., 2010)。さらに、認知機能や神経可塑性における T-VGCCs の働きの重要性が報告されている。例えば、Cav3.2 の欠損は海馬依存性

の記憶を障害する (Gangarossa et al., 2014)。加えて、視床背内側核における T-VGCCs は恐怖記憶の消去を調節する (Lee et al., 2012)。また、T-VGCCs 特異的阻害剤である Z944 によってラットの paired associate learning (PAL) 試験における成績が低下し (Roebuck et al., 2018)、同じく T-VGCCs 特異的阻害剤である NNC の処置によってマウス急性海馬スライスにおける長期増強 (LTP) が障害される (Zhao et al., 2017)。AD との関連では、老齢患者や AD 患者、さらには AD モデルマウスの一つである 3×Tg マウスの脳内において Cav3.1 の発現が減少している (Rice et al., 2014)。また、Rice らは (2014) T-VGCCs の阻害によって A $\beta$  の産生が増加することも実証した。さらに、A $\beta$  によるシナプス障害が T-VGCCs 電流の阻害を介していることが示された (Zhao et al., 2017)。これらの報告は T-VGCCs を活性化する薬剤が AD 治療の新たな治療候補薬になりえることを示唆する。

以前、当研究室では AD の新たな治療候補薬として T-VGCCs の活性化薬である ST101 (ZSET1446; spiro [imidazo[1,2-a] pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one) を全薬工業と共同で開発した。ST101 は T-VGCCs の活性化によって海馬におけるアセチルコリン (ACh) の放出を促進し (Yamamoto et al., 2013)、AD モデルマウスの一つである嗅球除去 (OBX) マウスの認知機能障害を改善する (Han et al., 2008)。これらの結果は T-VGCCs の活性化薬の AD 治療における有用性を示した。実際に、ST101 は米国において AD 患者に対する第 II 相臨床試験が行われた (Gauthier et al., 2015)。しかしながら、ドネペジルとの併用では有意な治療効果が認められたものの、単独投与での効果は弱かった。これを受けて当研究室では、ST101 よりも強力に T-VGCCs を活性化することが出来る薬剤である SAK3 (ethyl-8'-methyl-2',4-dioxo-2-(piperidin-1-yl)-2'H-spiro[cyclopentane-1,3'-imidazo[1,2-a]pyridin]-2-ene-3-carboxylate) を創製した (Yabuki et al., 2017b)。SAK3

は ST101 と比較して、マウス海馬における ACh 放出促進作用及び急性投与による認知機能改善効果がより強力であったことから、ST101 よりも有望な AD 治療薬候補薬である可能性が示唆された (Yabuki et al., 2017b)。

### 1.3. ユビキチンプロテアソーム系を標的とした AD 治療戦略

ユビキチンプロテアソーム系 (UPS) は細胞内における主要なタンパク質分解経路である (Schwartz and Ciechanover, 2009)。UPS の機能不全は細胞内における異常なタンパク質凝集を引き起こし、細胞機能の障害や細胞死などの原因となる (Schwartz and Ciechanover, 2009; Ciechanover and Kwon, 2015)。AD 患者では脳内におけるプロテアソーム活性の低下が過去に報告されている (Keller et al., 2000)。また、*in vitro* と *in vivo* での研究によって A $\beta$  がプロテアソームの活性を障害することが示されている (Lopez-Salon et al., 2003; Oh et al., 2005; Tseng et al., 2008)。またその一方で、A $\beta$  がプロテアソームによって分解されることも報告されている (Lopez-Salon et al., 2003; Tseng et al., 2008)。加えて、タウタンパク質もプロテアソームによって分解を受けることが知られている (Lokireddy et al., 2015)。興味深いことに、様々な研究によって、AD で障害されることが知られている神経可塑性や長期記憶形成といった神経機能においてプロテアソームの活性が必要であることが報告されている (Djakovic et al., 2009; Djakovic et al., 2012; Hamilton et al., 2012; Fonseca et al., 2006; Lopez-Salon et al., 2001)。さらに、ロリプラムによる cAMP-PKA シグナルを介したプロテアソームの活性化によって、タウタンパク質の病理を再現した AD モデルマウスにおける認知機能障害を改善することが示されている (Myeku et al., 2016)。これらの報告から、私はプロテアソーム活性を上昇させることは A $\beta$  やタウタンパク質の凝集抑制と認知機能障害の改善を同時に達成できる新たな AD 治療戦略であると考えた。



プロテアソーム 19S サブユニットの一つである Rpt6 の S120 残基のリン酸化はプロテアソームの活性化に寄与することが知られており、そのリン酸化を担う分子として PKA と CaMKII が報告されている。興味深いことに、Rpt6 のリン酸化によるプロテアソームの活性化が長期記憶形成やスパインの成長に必要であること、さらにその際のリン酸化を担うのは PKA ではなく CaMKII であるということが報告された (Jarome et al., 2013; Hamilton et al., 2012)。過去には、様々な研究によって A $\beta$  による CaMKII の自己リン酸化の低下が示されている (Zhao et al., 2004; Townsend et al., 2007; Min et al., 2013; Zhang et al., 2015)。これらのことから、CaMKII/Rpt6 シグナルの賦活化を介したプロテアソーム活性の上昇によって、AD における認知機能障害や A $\beta$  の沈着が改善される可能性が考えられた。我々は過去の研究で、SAK3 が T-VGCCs の活性化を介して CaMKII の自己リン酸化レベルを増加させることを報告している (Yabuki et al., 2017b, Xu et al., 2018)。従って、SAK3 は CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性化による AD 病態改善作用を持つことが推測される。

#### 1.4. 研究目的

本研究では、SAK3 が CaMKII/Rpt6 シグナルの賦活化を介したプロテアソームの活性化によって認知機能障害や A $\beta$  の沈着、スパイン異常といった AD 病態が改善されるという仮説の下、アルツハイマー病マウスを用いてその実証を試みた。最初に、SAK3 の投与が AD モデルマウスである App<sup>NL-F/NL-F</sup> (NL-F) 及び App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> (NL-G-F) ノックインマウスの認知機能障害及び A $\beta$  沈着に対して改善作用を示すか検討した。次に、NL-G-F マウスを用いて SAK3 が CaMKII/Rpt6 シグナルを介してプロテアソームを活性化するか検討した。最後に、SAK3 がマウス脳内に移行することを確認するために、血中およ

び脳内動態の検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1. 実験動物及び実験スケジュール

NL-F マウス及び NL-G-F マウスは理化学研究所において作製され、供与を受けた (Saito et al., 2014)。これらのマウスはアミロイド前駆タンパク質 (APP) やその代謝産物の過剰発現によるアーチファクトな表現型を排除したマウスであり、AD 研究に適したモデルマウスであると言える。対照群には野生型マウス (C57/BL6J) を使用した。全ての動物は東北大学大学院薬学研究科の動物実験施設において一定条件下 (温度  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 h : 12 h 明暗サイクル) で、適切な水・飼料を自由に与えて飼育を行った。なお、本論文に記載した動物およびその他の生体資料の取り扱いは、東北大学大学院薬学研究科実験動物委員会の承認を得て、東北大学動物実験指針に基づいて行った。

SAK3 は過去の方法に基づいて白鳥製薬に合成を依頼した (Abe et al., 2010; Yabuki et al., 2017b)。本研究の実験スケジュールは Fig. 1, 4, 6 に示した。慢性投与実験では、9 ヶ月齢のマウスに vehicle もしくは超純水に溶解した SAK3 (0.5 mg/kg) を 3 ヶ月間、1 日 1 回強制経口投与した。投与量はマウスの体重 10 g につき 0.1 mL とした。投与終了後、paired associate learning (PAL) 試験以外の行動試験を実施した。行動試験終了後に脳を取り出し、以降の実験に用いた。PAL 試験に関しては、マウスを 9 ヶ月齢より試験に付し、試験初めから試験終了後まで SAK3 の投与を行った。急性投与実験では、SAK3 (0.5 mg/kg) またはドネペジル (1.0 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) を経口投与し、30 分後に行動試験及びマイクロダイアリス法による検討を行った。

### 2.2. 行動試験

#### 2.2.1. Y 字迷路試験

Y 字迷路試験によって短期空間記憶学習を評価した (Yabuki et al., 2017b)。試験には黒いプレキシグラスでできた 3 本の同一アーム ( $50 \times 16 \times 32$  cm) から成る装置を使用した。マウスをアームの一つの端に置き、装置内を 8 分間自由に探索させた。アームへの総進入回数から 2 を引いたものを最大交替数、3 本のアーム全てに連続して進入する回数を交替行動として定義した。交替行動率は交替行動数/最大交替数  $\times 100$  で計算し、これを短期空間記憶学習能力の指標とした。

### 2.2.2. 新奇物体認識試験

新奇物体認識試験によって長期記憶を評価した (Yabuki et al., 2017b)。Training セッションでは、木でできた 2 つの同一形状の物体が対称に置かれた装置内 ( $35 \times 25 \times 35$  cm<sup>3</sup>) をマウスに 10 分間自由に探索させた。24 時間の test セッションでは、片方の物体を違う形状の新規物体に置換し、マウスに 5 分間自由に探索させた。各セッションの終了後、70% エタノールにより物体を拭くことでにおいによる認知を防止した。マウスが物体の上に乗る、触れる、1 cm 以内でにおいを嗅ぐ行為を探索行動として定義した。各セッションにおいて、総探索回数に対するそれぞれの物体への探索回数の割合を Discrimination index (%) として算出した。

### 2.2.3. 受動的回避学習試験

受動的回避学習試験は、これまでの報告と同様に行った (Yabuki et al., 2017b)。明室 ( $14 \times 10 \times 25$  cm<sup>3</sup>) 及び電気刺激装置に接続されたステンレス製の棒を床とする暗室 ( $25 \times 25 \times 25$  cm<sup>3</sup>) が扉でつながった装置を使用した (Nihon Kohden, Tokyo, Japan)。Training セッションでは、マウスを明室に入れ、

暗室に移動した際に扉を閉めて電気刺激を与えた (0.3 mA, 2 sec)。24 時間後の test セッションでは、再びマウスを明室に入れ、暗室へ移動するまでの時間を最大 300 秒測定した。

#### **2.2.4. 自発運動量測定**

マウスをエサと水を自由に摂取できるケージ内で飼育し、12 時間の明暗サイクル (light; 09:00-21:00, dark; 21:00-9:00) の元、赤外線センサー装置 (Digital Acquisition System) (Neuroscience, Inc., Tokyo, Japan) によって 72 時間の自発運動量を測定した。

#### **2.2.5. PAL 試験**

##### **2.2.5.1. PAL 試験装置**

タッチスクリーン試験装置として音と光を遮るボックス内に入った操作チャンバーを用いた。台形の各チャンバー (長辺 = 25 cm; 短辺 = 6 cm; 高さ = 18 cm) にはそれぞれ報酬の供給口、ハウスライト、音発生装置、液体の報酬供給装置、タッチスクリーンが備え付けられている (Bussey Mouse Touchscreen Chamber, Campden Instruments, U.K.)。報酬の供給口は台形の短辺側、タッチスクリーンは長辺側に取り付けられている。タッチスクリーンはチャンバーの床から 3.6 cm に位置するように設計された 0.4 cm 間隔で並ぶ 3 つの正方形のウィンドウ (長さ = 7 cm; 高さ = 7 cm) を持つ黒いプレキシグラスのカバーで覆われており、このウィンドウを通して異なる視覚刺激を画面に表示できるようになっている。試験の実施及び試験データの取得は ABET II Touch software (Campden Instruments) を用いて行った。

#### 2.2.5.2. PAL 試験のためのプレトレーニング

トレーニングを実施する前に、マウスのエサを制限し体重を通常の約 85% に維持した。PAL 試験のトレーニングは以前の報告に基づいて行った (Horner et al., 2013; Oomen et al., 2013)。初めに、マウスを試験装置に慣れさせるため、全ての光を消した状態のチャンバー内に 10 分間入れた (Habituation 1)。翌日、音と報酬 (10% condensed milk) を関連付けさせるためのトレーニングを行った。まず初めに、音とともに報酬 (150  $\mu$ L) が供給される。マウスがそれを獲得し報酬トレイを離れてから 10 秒後、音と報酬トレイの照明とともに再度報酬 (7  $\mu$ L) が供給される。この一連の動作を 20 分間のセッションが終了するまで繰り返した (Habituation 2)。続いて、マウスが 3 つのウィンドウのうちの 1 つにランダムに表示される白い正方形の刺激に触れるようトレーニングを行った (Initial touch training)。マウスが刺激に触れることなく 30 秒経過した時点で画像は消え、音と報酬トレイの照明とともに報酬が供給される。マウスが触れた場合には多めの報酬 (21  $\mu$ L) が同様の条件で供給される。これを 1 トライアルとし、マウスが報酬を受け取ってから 20 秒後、次のトライアルが自動的に開始される (criterion: completion of 36 trials in 60 min)。次のトレーニングでは (Must touch training)、時間の経過で刺激が消えないようになり、報酬を受け取るためには刺激をタッチしなければならない (criterion: completion of 36 trials in 60 min)。次のトレーニングでは (Must initiate training)、マウスはスクリーンに刺激を表示させるために報酬トレイを鼻で突かなければならない (criterion: completion of 36 trials in 60min)。最後のトレーニングでは (Punish incorrect training)、何も表示されていないスクリーンに触れた場合、報酬が供給されず罰としてハウスライトが 5 秒間点灯するという条件が追加される (criterion: 27/36 trials correct in 60 min for 2 consecutive days)。

### 2.2.5.3. PAL 試験

プレトレーニングの終了後、PAL 試験 (dPAL) のためのトレーニングを行った。セッションの開始時に、マウスは初めのトライアルを開始するために報酬トレイを鼻で突かなければならない。トライアルでは 3 つのウィンドウの内 2 つに花、飛行機、蜘蛛の中からそれぞれ異なったものが選択され、表示される。表示されるパターンとしては 6 パターンが存在し、それぞれどちらか一方は正解の刺激 (S+)、もう一方は不正解の刺激 (S-) である (Fig. 12A)。マウスが報酬を得るためには正しい刺激に触れなければならない。このトレーニングでは、マウスの S- へのタッチは無視され、罰を受けることは無い。60 分間で 36 トライアルの完了をクライテリアとし、終了したマウスは dPAL 試験を開始した。dPAL 試験では S- へ触れると報酬が与えられず、罰としてハウスライトが 5 秒間点灯するようになる。また、その次のトライアルでは同じパターンの刺激が表示され、マウスが正解するまで繰り返される。これをコレクショントライアルとし、総トライアル回数と正解率の算出から除くこととした。60 分間で最大 36 トライアルを実施し、1 日 1 回 50 日間継続した。

## 2.3. A $\beta$ ELISA

過去の報告に従い、ELISA 法によって A $\beta$  の定量を行った (Saito et al., 2014)。マウスの皮質領域を摘出し、Tris-HCl buffered saline にてホモジナイズ後、20 分間遠心した ( $200,000 \times g$ , 4 °C)。その上清を soluble fraction とした。ペレットは 6 M guanidine-HCl buffer にて溶解し、再び 20 分間遠心した後 ( $200,000 \times g$ , 4 °C)、その上清を insoluble fraction とした。それぞれのフラクションにおける guanidine-HCl の濃度が 0.5 M になるように調製を行った後、A $\beta$  キット (Wako Pure Chemicals) を用いて A $\beta_{40}$  と A $\beta_{42}$  の量をそれぞれ測定した。

## 2.4. Thioflavin-S 染色と免疫組織化学染色

マウスを氷冷した phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) にて還流し、その後 4% パラホルムアルデヒド (PFA) によって還流した。取り出した脳を 4°C において 4% PFA により一晩再固定した後、ビブラトーム (Dosaka EM Co. Ltd., Kyoto, Japan) により 50  $\mu$ m の厚さにスライスした。Thioflavin-S 染色は過去の報告に基づいて行った (Bussière et al., 2004)。切片を PBS で洗浄後、0.25% 過マンガン酸カリウム (Sigma-Aldrich) 溶液にて 10 分間インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、2% ピロ亜硫酸カリウム (Sigma-Aldrich) と 1% シュウ酸 (Sigma-Aldrich) の混合溶液にてスライス全体が白くなるまでインキュベートした。超純水でスライスを洗浄し、50% エタノールに溶解した 0.015% thioflavin-S (Sigma-Aldrich) にて 10 分間染色した。その後、50% エタノールと超純水で洗浄し、VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) を用いて封入した。蛍光顕微鏡 (DMI3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で画像を撮影し、A $\beta$  プラークの数と面積を Leica Application Suite v4.2 software を用いて解析した。

免疫組織化学染色では、切片を 0.1% Triton X-100 を含む PBS で膜透過処理を行った後、非特異的な抗体の結合を防ぐためにブロッキングバッファー (1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1% Triton X-100 in PBS) で 1 時間インキュベートした。ブロッキング後、切片を一次抗体としてブロッキングバッファーで希釈した 6E10 モノクローナル抗体 (1:1000; BioLegend, 803001, San Diego, CA, USA) 及び抗 NeuN ポリクローナル抗体 (1:1000; Abcam, ab177487, Cambridge, UK) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、切片をブロッキングバッファーで希釈した 2 次抗体 (Alexa 594-conjugated anti-mouse or -rabbit IgG antibody, 1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) と一晩反応させた。



その後、PBS で洗浄し、6E10 で染色した切片は thioflavin-S 染色を行い、NeuN で染色した切片は VECTASHIELD を用いて封入した。染色画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP8, Leica Microsystems) を使用して撮影した。

## 2.5. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は過去の報告と同様に行った (Oka et al., 2016)。マウスを断頭し脳を摘出後、皮質領域を取り出し、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いてメーカーのプロトコル通りに total RNA を抽出した。RNA の品質を Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies Ltd., Santa Clara, CA, USA) を用いて確認した後、RNA integrity number が 9.0 以上のものをマイクロアレイ解析に用いた。マイクロアレイ解析は Affymetrix Mouse 2.0 Gene ST Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) を使用して行った。解析では、34,472 遺伝子の内 27,036 遺伝子について mRNA の発現量を比較した。まず初めに以下の 2 つの基準を基に遺伝子を抽出した。1)  $P < 0.05$  in one-way ANOVA, 2)  $> 1.2$ - or  $< -1.2$ -fold change (linear) (about 15% increase or decrease)。これによって、野生型マウスと vehicle を投与した NL-F マウス及び vehicle を投与した NL-F マウスと SAK3 を投与した NL-F マウスを比較した際に、それぞれ 490 遺伝子と 461 遺伝子が抽出された。続いて、各遺伝子リストについて、Transcriptome Analysis Console (Affymetrix Inc.) を使用して階層的クラスタリングを行った。以下に示すクライテリアによって遺伝子を絞り込んだところ、野生型マウスと vehicle を投与した NL-F マウス及び vehicle を投与した NL-F マウスと SAK3 を投与した NL-F マウスを比較した際に、それぞれ 100 遺伝子と 58 遺伝子が抽出された。3) expression level  $[\log_2] > 6.6$  at least in each group, for the selection of genes with notable alteration。また、そ

これらの転写産物について、Ingenuity Pathway Analysis Software (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA) を用いたパスイ解析を行った。

## 2.6. リアルタイム PCR 解析

リアルタイム定量 PCR 解析は過去の報告に基づいて行った (Shioda et al., 2015)。TRI Reagent (Sigma-Aldrich) を使用してマウスの皮質領域から Total RNA を抽出し、oligo (dT) primer (Promega) と Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて一本鎖 cDNA に逆転写した。定量 PCR は iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用いて 48-well plates (Mini Opticon real-time PCR system, Bio-Rad) により行った。本研究で用いたプライマーの配列は以下のとおりである。 *Adam10* primers; 5'-GGGAAGAAATGCAAGCTGAA-3' and 5'-CTGTACAGCAGGGTCCTTGAC-3'; *Bace1* primers; 5'-TTCATCAACGGCTCCAACT-3' and 5'-CTCCAGGGAGTCGTCAGG-3'; *Mme* primers; 5'-TCCTGACTATCATAGCGGTGAC-3' and 5'-GACGTTGCGTTTCAACCAGC-3'; *Sgk1* primers; 5'-GGGTGCCAAGGATGACTTTA-3' and 5'-CTCGGTAAACTCGGGATCAA-3'; *Gapdh* primers; 5'-TGACGTGCCGCCTGGAGAAA-3' and 5'-AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG-3'。遺伝子発現は GAPDH を用いて標準化した後、比較 Ct 法により評価した。また、コントロールとの比は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  により算出した。

## 2.7. In vivo マイクロダイアリシス法による ACh 遊離の測定

マイクロダイアリシス解析には 7-9 ヶ月齢のマウスを使用した。脳定位固定装置 (SR-5M-HT; Narishige, Tokyo, Japan) を使用してマウスの海馬 CA1 領域

の上の頭蓋に穴を開けた [2.0 mm posterior and 1.4 mm lateral to the bregma and 1.5 mm below the surface]。なお、穴の位置は過去の報告に基づいて決定した (Paxinos and Franklin, 2001)。穴を通してガイドカニューレ (AG-4; Eicom, Kyoto, Japan) を挿入した後、歯科用セメントを用いて穴を塞ぎ、ガイドカニューレを固定した。マウスが回復した後、ガイドカニューレを通してマイクロダイアリスプローブ (A-I-4-02; Eicom) を挿入した。プローブには micro-syringe pump (ESP-64; Eicom) を用いてリンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, and 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>) が 1.25  $\mu$ L/min の流速で還流しており、マウスの行動は制限されていない。オートインジェクター (EAS-20; Eicom) と high-performance liquid chromatography (HPLC)-Electrochemical detector (ECD) system (HTEC-500; Eicom) を用いて 20 分間毎の透析液を分析した。ACh の放出が安定した後、マウスに Vehicle、SAK3 (0.5 mg/kg) またはドネペジル (1.0 mg/kg) を経口投与し、その後の ACh 遊離を測定した。ACh の遊離は 20 分毎の試料濃度 (fmol/20 min) によって評価し、60 分間の ACh 遊離レベル (fmol  $\times$  60 min) も算出した。

## 2.8. プロテアソーム活性測定

マウスの皮質領域を摘出し、使用するまで -80°C で保存した。組織を氷冷したホモジナイズバッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1 mM DTT and 2 mM ATP) でホモジナイズし、15 分間遠心した (15,000 rpm, 4 °C)。タンパク質濃度は Bradford 法により測定した。同量のタンパク質をアッセイバッファー (25 mM HEPES, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.05% NP-40) 内で 200  $\mu$ M の蛍光発生ペプチド(LLVY-AMC (Millipore, Bedford, MA, USA), Bz-VGR-AMC (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA), Z-LLE-AMC (Enzo Life Science)) とそれぞれ混合し、37°C で 1 時間インキュベ

トした。インキュベーション後、サンプルの蛍光 (380/460 nm (Ex/Em)) を蛍光計を用いて測定した (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, San Jose, CA, USA)。

## 2.9. グリセロール密度勾配法

グリセロール密度勾配法は過去の報告に従って実施した (Tanahashi et al., 2000)。脳組織を氷冷したホモジナイズバッファー (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol (DTT)) with or without 2 mM ATP) でホモジナイズした後、30 分間遠心した ( $15,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )。タンパク質濃度を Bradford 法により測定し、同量のタンパク質を含む上清を ATP-regenerating system (10 mM creatine phosphate, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10  $\mu\text{g/mL}$  creatine kinase) もしくは ATP-depleting system (10 mM glucose and 1  $\mu\text{g/mL}$  hexokinase) とともに  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、10-40% のグリセロール密度勾配遠心に付した ( $83,000 \times g$ , 22 h,  $4^{\circ}\text{C}$ )。遠心後のサンプルを 30 フラクションに分け、各フラクションから同量のサンプルを 0.05% の SDS を含んだアッセイバッファー内で 200  $\mu\text{M}$  の Suc-LLVY-AMC と混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、蛍光計によってサンプルの蛍光 (380/460 nm (Ex/Em)) を測定した。

## 2.10. 免疫ブロット法

免疫ブロット法は過去の報告と同様に行った (Yabuki et al., 2019)。マウスの海馬 CA1 領域を摘出し、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。組織を氷冷したホモジナイズバッファー (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 40 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM NaF, 100 nM calyculin A, 50  $\mu\text{g/mL}$  leupeptin, 25  $\mu\text{g/mL}$  pepstatin A, 50  $\mu\text{g/mL}$  trypsin

inhibitor, and 1 mM DTT) でホモジナイズした後、10 分間遠心し (15,000 rpm, 4°C)、上清を分離した。タンパク質濃度を Bradford 法により測定後、サンプルに Laemmli's sample buffer (0.38 M Tris-HCl, pH 6.8, 30% 2-mercaptoethanol, 15% glycerol, 12% SDS, and 0.05% bromophenol blue) を加え、100°C で 3 分間加熱した。タンパク質濃度を調製し、12% SDS- ポリアクリルアミドゲルにサンプルをアプライし、80 mA で 150 分間 SDS-PAGE を行った。泳動後、タンパク質を PVDF メンブレンに 70 V で 120 分間転写した。転写後、抗体の非特異的結合を防ぐためにスキムミルクを 5% の濃度で溶解した T-TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) 溶液中にメンブレンを浸し、常温で 30 分間ブロッキングした。その後、メンブレンを T-TBS 溶液で希釈した anti-phospho-CaMKII (1:5000; Fukunaga et al., 1988), anti-CaMKII (1:5000; Fukunaga et al., 1988), anti-phospho-Rpt6 (1:500; MBS9429032, MyBioSource, San Diego, CA, USA), anti-Rpt6 (1:1000; BML-PW9265, Enzo Life Science), anti-Synaptophysin (1:1000; S-5768, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anti-PSD95 (1:1000; ab2723, abcam, Cambridge, UK), anti- $\beta$ -actin (1:5,000; A5551, Sigma-Aldrich) 抗体と 4°C で一晩反応させた。T-TBS 溶液で洗浄後、メンブレンを T-TBS 溶液で希釈した Horseradish peroxidase-conjugated-labeled anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:5000; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) と常温で 2 時間反応させた。T-TBS 溶液で洗浄後、Enhanced ChemiLuminescence (ECL) immunoblotting detection system によって発光させたバンドを luminescent image analyzer LAS-4000 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。タンパク質の定量解析には Image Gauge version 3.41 (Fuji Film) を用いた。

## 2.11. ルシファーイエローを用いたスパインの形態解析

ルシファーイエロー (LY) を用いたスパインの形態解析は過去の報告に基づいて行った (Shioda et al., 2011)。マウスを麻酔下で氷冷した PBS によって還流した後、4% PFA によって還流した。その後、脳を摘出し 4% PFA によって 4°C で一晩後固定した。ビブラトーム (DTK-1000, Dosaka EM Co. Ltd.) を用いて 250  $\mu\text{m}$  の厚さの冠状切片を作製した。切片の皮質領域及び海馬 CA1 領域にある神経細胞に LY を注入し、その後 4% PFA を用いて一晩 4°C で切片を固定した。PBS にて洗浄後、ブロッッキングソリューション (1% BSA, 0.3% Triton X-100, and 0.1%  $\text{NaN}_3$  in PBS) を用いて室温で 1 時間ブロッッキングした。その後、ブロッッキングバッファーで希釈した anti-LY antibody (1:1000; A-5750, Invitrogen, Waltham, MA, USA) 抗体と 4°C で 3 日間反応させた。PBS で洗浄後、Alexa 488 anti-rabbit IgG (1:500; Invitrogen) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、VECTASHIELD (Vector Laboratories) を用いて封入した。蛍光画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP8, Leica Microsystems) を用いて撮影し、スパインの長さとの幅の測定には ImageJ software (National Institutes of Health freeware) を使用した。スパインの形態は過去の報告に基づいて評価した (Mucha et al., 2011; Risher et al., 2014): filopodia spines->2  $\mu\text{m}$  in length, <0.5  $\mu\text{m}$  in width, without a distinct spine head; thin spines-<2  $\mu\text{m}$  in length, <0.5  $\mu\text{m}$  in width, with a neck; stubby spines-<2  $\mu\text{m}$  in length, >0.5  $\mu\text{m}$  in width, <1 length-to-width ratio; mushroom spines-<2  $\mu\text{m}$  in length, >0.5  $\mu\text{m}$  in width。

## 2.12. 体内動態検討

SAK3- $d_{10}$  (0.5 mg/kg) をマウスに経口投与し、その後血液と脳サンプルを経時的に採取した。血液を採取したチューブにヘパリン (1.2 U/mL) を加えて遠心し (16,500  $\times g$ , 10 min, 4°C)、その上清を血漿として回収した。すべてのサンプル

は使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。血漿サンプル調製については、内部標準物質 (IS) として SAK6 ( $0.4\text{ ng/mL}$ ) を含む  $250\text{ }\mu\text{L}$  のアセトニトリルを血漿に加えた後に 10 分間超音波処理を行い除タンパクした。その後、遠心分離 ( $16,500\times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を行い、得られた上清を真空減圧遠心 (CC-105, TOMY, Tokyo, Japan) にて蒸発乾固した。残留物を  $25\text{ }\mu\text{L}$  の 25% アセトニトリルに溶解しサンプルとした。脳サンプル調製については、半脳にアセトニトリル  $1\text{ mL}$  と IS ( $0.4\text{ ng/mL}$ ) を含むアセトニトリルを  $250\text{ }\mu\text{L}$  加え、BEADS CRUSHER ( $\mu\text{T-12}$ , TAITEC, Saitama, Japan) によってホモジナイズした後 ( $3,200\text{ rpm}$ , 1 min)、遠心分離した ( $16,500\times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )。上清を真空減圧遠心によって蒸発乾固した後、残留物に  $25\text{ }\mu\text{L}$  の 25% アセトニトリルを加え、フィルター (pore size,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ , Millipore, Billerica, MA, USA) を通過させたものをサンプルとした。

超高速高分離液体クロマトグラフィー (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して、検体を ACQUITY UPLC® BEH Phenyl column ( $2.1\times 50\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ , Waters, Milford, MA, USA) を用いて  $40^{\circ}\text{C}$  で分離した。移動相の条件は isocratic mode を使用し、その組成は 75% A 相: water containing 0.1% formic acid, 25% B 相: acetonitrile containing 0.1% formic acid とし、流速は  $300\text{ }\mu\text{L/min}$  に設定した。また、測定には  $5\text{ }\mu\text{L}$  のサンプルを使用した。質量分析にはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) -三連四重極質量分析計である TSQ Vantage mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。質量分析には選択反応モニタリング (SRM) を使用した (SAK3- $d_{10}$ ;  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^{+}$   $380.2 > 334.2$ , SAK6;  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^{+}$   $378.1 > 332.1$ )。

### 2.13. 統計解析

全てのデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で算出した。統計上有意な差に関して

は、二群間比較については Student's *t* test により検定処理した。他群間比較には one-way または two-way analysis of variance (ANOVA) によって評価した後、Dunnett's test もしくは Tukey's test によって検定処理を行った。検定処理には GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用し、危険率 5% 未満をもって統計上有意差有りと判定した。



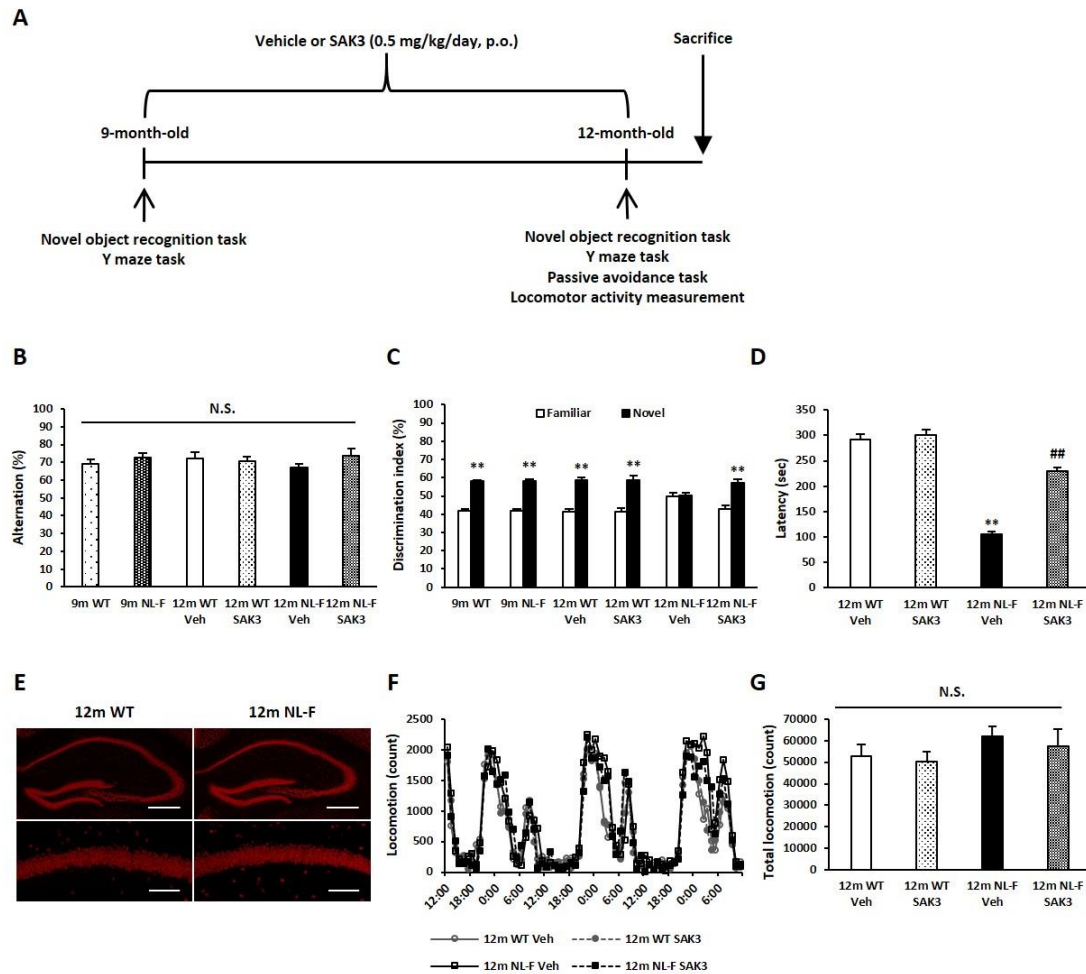
### 3. 結果

#### 3.1. SAK3 は App ノックインマウスにおける認知機能障害を改善し A $\beta$ 沈着を抑制する

##### 3.1.1. SAK3 の慢性投与により NL-F マウスの認知機能障害が改善する

近年樹立された AD モデルマウスである App<sup>NL-F/NL-F</sup> ノックイン (NL-F) マウスに認められる認知機能障害に対する SAK3 の慢性投与による改善効果を行動試験によって評価した。まず初めに、SAK3 投与開始前 9 ヶ月齢の時点での認知機能を Y 字迷路試験と新奇物体認識試験によって評価した (Fig. 1)。それぞれの試験において、NL-F マウスの空間記憶学習能力及び認知機能は WT マウスと比べて変化はなかった (Fig. 1A, B)。その後、SAK3 を 3 ヶ月間慢性投与し、12 ヶ月齢の時点で再度認知機能の評価した。Y 字迷路試験ではすべての群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 1A)。新奇物体認識試験の training セッションではすべての群で有意な変化は認められなかった。一方で、test セッションでは NL-F マウスは既知物体と新奇物体を区別できず、物体識別能力の低下が認められた (Fig. 1B)。この物体識別能力の低下は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した (Fig. 1B)。受動的回避学習試験の training セッションでは、各群間に有意な差は認められなかった。一方で、test セッションでは NL-F マウスは暗室に移動するまでの時間が WT マウスに比べて有意に減少した ( $105.8 \pm 41.2$  sec,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice)。この移動時間の減少は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した ( $230.2 \pm 31.3$  sec,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice: Fig. 1C)。続いて、NeuN 染色によって WT マウスと NL-F マウスの海馬領域における神経細胞死について評価を行ったが、両群において明

らかな変化は認められなかった (Fig. 1D)。最後に、総運動量及び概日リズムを指標として BPSD の評価を行うために 72 時間の自発運動量測定を行った。しかしながら、NL-F マウスには明期、暗期ともに明らかな運動量の変化は認められなかった (Fig. 1E, F)。



**Fig. 1. Chronic SAK3 administration improves cognitive deficits in NL-F mice. (A)**

Experimental schedule used in chronic administration study. (B) Alternations in a Y maze

task were not changed among all groups (12m WT: n = 15; 9m NL-F: n = 13; 12m WT

Veh: n = 7; 12m WT SAK3: n = 8; 12m NL-F Veh: n = 6; 12m NL-F SAK3: n = 7) Error

bars represent SEM. (C) Chronic SAK3 (0.5 mg/kg/day, p.o.) administration improved

decreased discrimination index in 12-months aged NL-F mice (9m WT: n = 15; 9m NL-

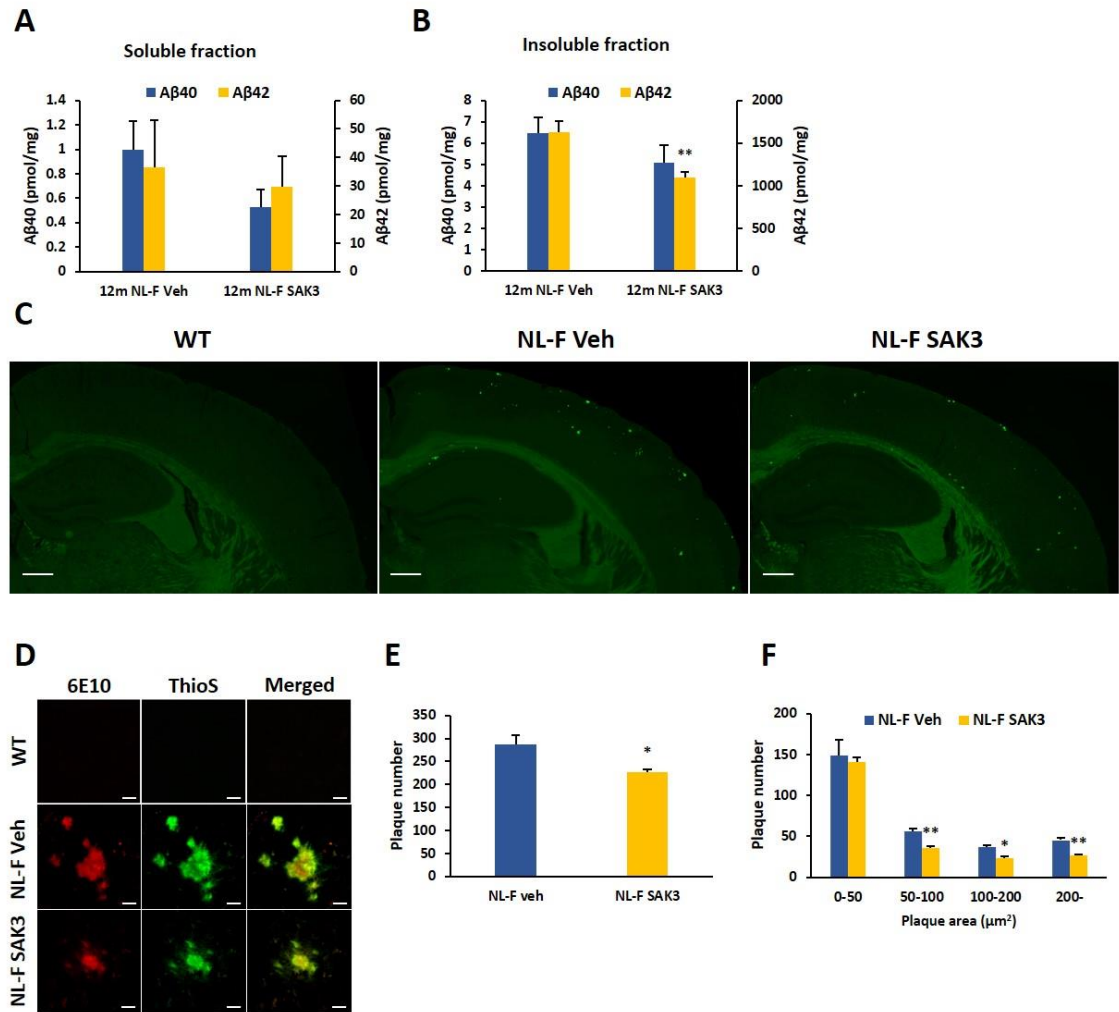
F: n = 13; 12m WT Veh: n = 7; 12m WT SAK3: n = 8; 12m NL-F Veh: n = 6; 12m NL-F

SAK3: n = 7). Error bars represent SEM.  $**p < 0.01$  vs. the familiar group. (D) Decreased latency time of NL-F mice in test session was improved by chronic SAK3 administration (12m WT Veh: n = 7; 12m WT SAK3: n = 8; 12m NL-F Veh: n = 6; 12m NL-F SAK3: n = 7). Error bars represent SEM.  $**p < 0.01$  vs. vehicle-treated wild-type mice;  $## p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice. (E) No obvious neuronal cell death was seen in 12-months aged NL-F mice. Scale bars: low magnification, 400  $\mu\text{m}$ ; high magnification, 100  $\mu\text{m}$ . (F) (G) Spontaneous locomotor activity in both light and dark phase (F) and the sum of 48 hr (G) was not significantly changed among all groups (12m WT Veh: n = 6; 12m WT SAK3: n = 6; 12m NL-F Veh: n = 6; 12m NL-F SAK3: n = 7). Error bars represent SEM.

### 3.1.2. SAK3 の慢性投与は NL-F マウスにおける A $\beta$ の沈着を抑制する

A $\beta$  の沈着は AD における病理学的特徴の一つであることから、SAK3 の慢性投与が NL-F マウスにおける A $\beta$  の沈着を抑制するかについて検討を行った。まず初めに、皮質領域を Tris-HCl buffered saline に可溶化するフラクション (Soluble fraction) と 6 M guanidine-HCl buffer に可溶化するフラクション (Insoluble fraction) に分けて ELISA 法により A $\beta$  の定量を行った。両フラクションにおける A $\beta_{40}$  の量に変化は認められなかったものの、insoluble fraction における A $\beta_{42}$  の量は SAK3 の慢性投与によって有意に減少した ( $1096.8 \pm 59.7$  pmol/mg,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice: Fig. 2A, B)。続いて、A $\beta$  の沈着をアミロイド構造を認識する試薬である Thioflavin-S と A $\beta$  の抗体である 6E10 によって染色し、評価した。Fig 2C, D には、vehicle 及び SAK3 を投与した NL-F マウスにおける A $\beta$  プラークの染色像を示した。これを定量的に解析した結果、海馬を含む脳全体における A $\beta$  プラークの数は SAK3 の慢性投与によって有意に減少した ( $227.8 \pm 5.6$ ,  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated NL-F mice: Fig. 2E)。また、プラークの数及びその面積によってヒストグラムを作成したところ、比較的大きいサイズのプラークが減少していることが分かった ( $50-100 \mu\text{m}^2$ ;  $35.4 \pm 3.4$ ,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice;  $100-200 \mu\text{m}^2$ ;  $23.8 \pm 3.0$ ,  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated NL-F mice;  $200- \mu\text{m}^2$ ;  $27.2 \pm 2.8$ ,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice: Fig. 2F)。皮質領域と海馬領域を分けて解析したところ、皮質領域ではその面積に占める A $\beta$  プラークの面積の割合が海馬領域と比較してより多かった (cortex:  $0.15 \pm 0.013$  % of area, hippocampus:  $0.027 \pm 0.0083$  % of area)。SAK3 の慢性投与により、皮質領域における A $\beta$  プラークの面積の割合は有意に減少した ( $0.074 \pm 0.0093$  % of area,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-F mice)。一方で、海馬領域では減少する傾向は認められたものの、その差は有意ではなかった ( $0.013 \pm 0.0019$  %

of area,  $p = 0.16$  vs. vehicle-treated NL-F mice).



**Fig. 2. Chronic oral administration of SAK3 inhibits Aβ deposition.** (A) Quantification of Aβ<sub>40</sub> and (B) Aβ<sub>42</sub> levels in soluble and insoluble fractions by ELISA (n = 5-9 per group). Error bars represent SEM. \*\**p* < 0.01 vs. vehicle-treated NL-F mice. (C) Aβ plaques detected by Thioflavin-S staining in cortex and hippocampal region. Scale bar: 500 μm. (D) Representative double-staining images with 6E10 and Thioflavin-S. Scale bar: 10 μm. (E) Total Aβ plaque numbers and were measured. (n = 5 per group). Error bars represent SEM. \**p* < 0.05 vs. vehicle-treated NL-F mice. (F) A Histogram of

number and area of A $\beta$  plaques (n = 5 per group). Error bars represent SEM. \* $p$  < 0.05,

\*\* $p$  < 0.01 vs. vehicle-treated NL-F mice.



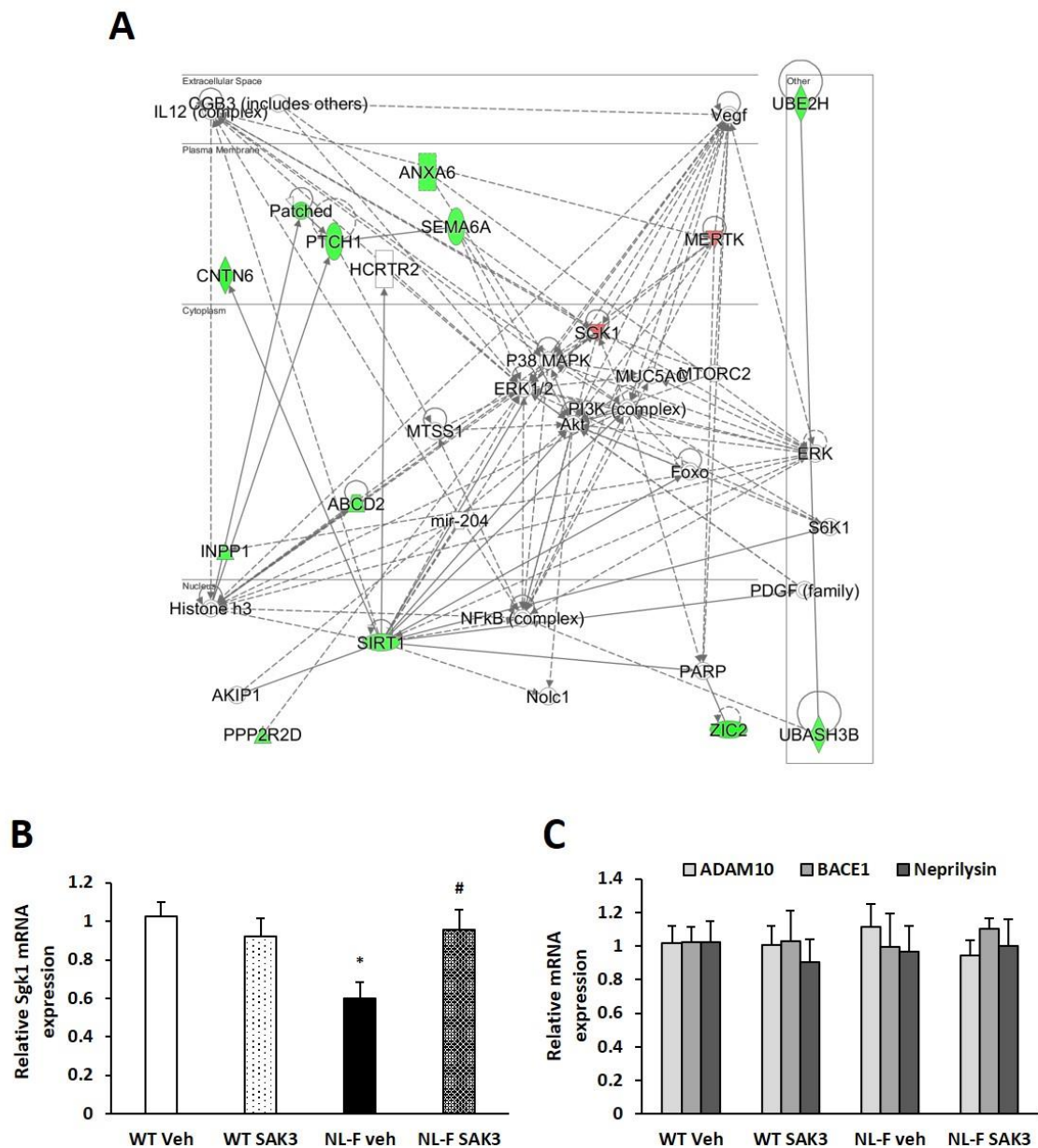
### 3.1.3. SAK3 の慢性投与は NL-F マウスで減少した *Sgk1* の mRNA 量を回復させる

次に、SAK3 による NL-F マウスの認知機能障害改善及び A $\beta$  沈着抑制効果のメカニズムの一端を解明すべく、マイクロアレイ解析により mRNA の発現量変化を検討した。p < 0.05 in one-way ANOVA 及び over about 15% changes in expression levels [ $> 1.2$  or  $< -1.2$ -fold change (linear)] という二つの基準を基に解析を行った。結果、WT マウスと比べて NL-F マウスでは 207 遺伝子の発現上昇と 283 遺伝子の発現低下が認められた。また、vehicle を投与した NL-F マウスと SAK3 を投与した NL-F マウスを比較した際には 284 遺伝子の発現上昇と 177 遺伝子の発現低下が認められた。これらの結果は遺伝子型と SAK3 投与の有無の両方の要因が遺伝子発現に影響を与えることを示唆している。顕著な発現変化がある遺伝子をさらに絞り込むために以下の基準によって更なる解析を行った (criteria: expression level [ $\log_2$ ]  $> 6.6$  in at least one group)。結果、WT マウスと比較して NL-F マウスでは 32 遺伝子の発現上昇と 68 遺伝子の発現低下が認められた。また、vehicle を投与した NL-F マウスと SAK3 を投与した NL-F を比べた際には 37 遺伝子の発現上昇と 21 遺伝子の発現低下が認められた。その中で、NL-F マウスで発現が変化し、それが SAK3 の投与によって回復するものとして 5 つの遺伝子が見つかったが、それらは機能がほとんど解明されていないものであった。パスウェイ解析によって、遺伝子型と SAK3 の投与によって発現が著しく変化した遺伝子には細胞の生存に関与するものが多いことが分かった。SAK3 を投与した NL-F マウスでは細胞死と生存や神経疾患に関わるものとして 2 遺伝子の発現上昇 (*Mertk*, *Sgk1*) 及び 11 遺伝子の発現低下 (*Abcd2*, *Anxa6*, *Cntn6*, *Inpp1*, *Ppp2r2d*, *Ptch1*, *Sema6a*, *Sirt1*, *Ubash3b*, *Ube2h*, *Zic2*) が認められた (Fig. 3A)。それらの内、serum- and glucocorticoid-induced protein

kinase 1 (*Sgkl*) の mRNA 発現量は SAK3 の投与により有意に増加しており ( $p < 0.05$ ; 1.32-fold increase) 、また、有意差は無かったものの WT マウスと比較して NL-F マウスで減少している傾向が認められたことから ( $p = 0.061$ ; -1.38-fold decrease)、RT-qPCR 法によって再度 mRNA 発現量についての解析を行った (Fig. 3B)。その結果、*Sgkl* の mRNA 量は WT マウスと比較して NL-F マウスにおいて有意に減少しており、またその減少は SAK3 の慢性投与によって有意に回復した。

#### 3.1.4. SAK3 の投与は APP の切断に関わる遺伝子や A $\beta$ の分解に関わる遺伝子の発現に影響しない

次に、APP の切断に関わる分子として知られている ADAM10 と BACE1 及び A $\beta$  を分解する分子として知られている neprilysin (Iwata et al., 2000) についてその遺伝子発現を検討した。マイクロアレイ解析では、それら 3 つの mRNA (*Adam10*, *Bace1*, *Mme*) 発現量について WT マウスと NL-F マウスの間に変化は認められなかった。(*Adam10* mRNA;  $p = 0.97$  and 1.00-fold, *Bace1* mRNA;  $p = 0.39$  and 1.01-fold, *Mme* mRNA;  $p = 0.81$  and 1.01-fold). また、SAK3 の投与でも NL-F マウスにおけるそれらの遺伝子発現に変化はなかった (*Adam10* mRNA;  $p = 0.76$  and -1.00-fold, *Bace1* mRNA;  $p = 0.57$  and 1.01-fold, *Mme* mRNA;  $p = 0.37$  and 1.14-fold)。RT-qPCR 法によってもそれらの遺伝子発現が変化しないことを確認した (Fig. 5C)。これらの結果から、遺伝子型と SAK3 の投与が APP を切断する分子や A $\beta$  を分解する分子の遺伝子発現には影響しないことが示された。



**Fig. 3. SAK3 treatment alter the expressions of genes involving neurological disease**

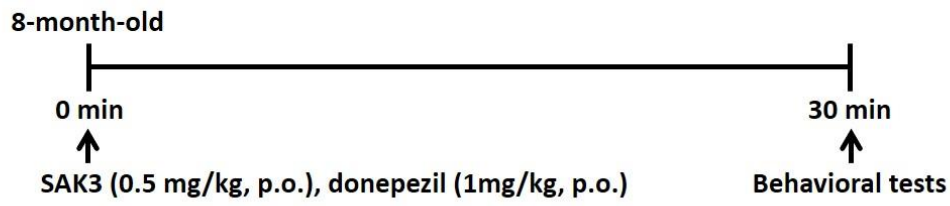
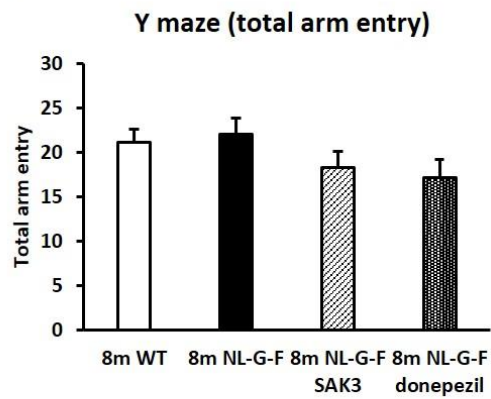
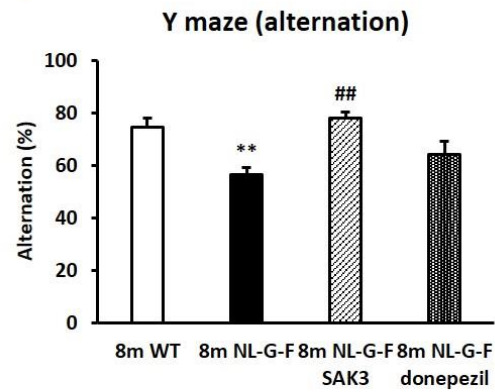
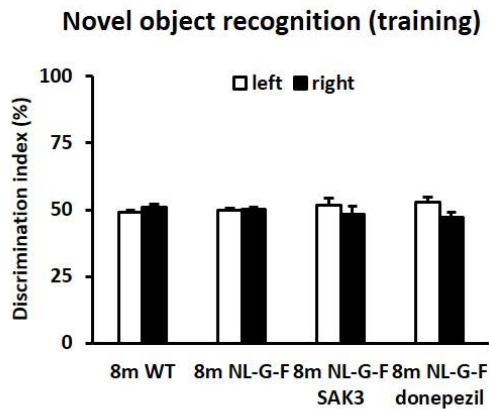
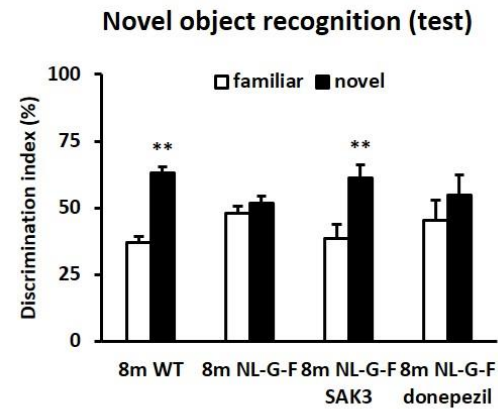
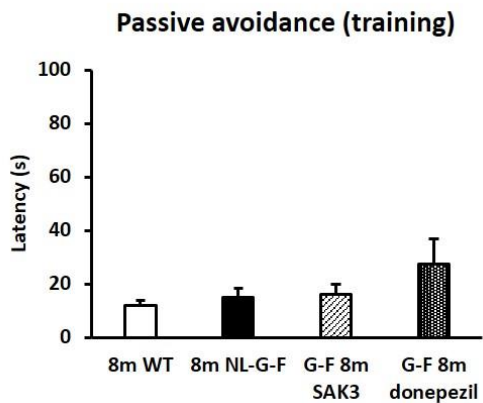
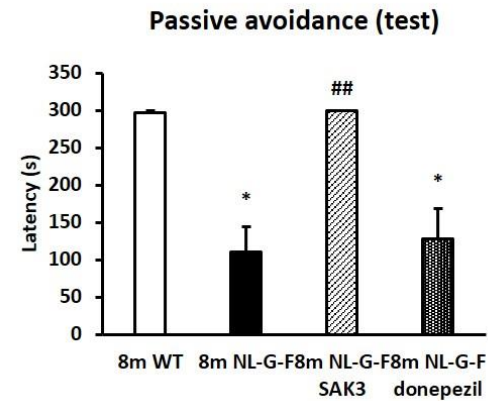
**including *Sgk1*, but not genes involved in APP processing and A $\beta$  degradation. (A)**

Network involving in cell death and survival, cellular compromise, neurological disease was significantly altered in SAK3-treated NL-F mice. Solid and dashed line implicates the direct and indirect interaction respectively. Upregulated genes were shown in red, and

downregulated genes were shown in green. (B) (C) Real-time PCR showing *Sgk1* (B) and *Adam10*, *Bace1*, *Mme* (encoding Neprilysin) (C) mRNA expression levels. (12m WT Veh: n = 4; 12m WT SAK3: n = 4; 12m NL-F Veh: n = 4; 12m NL-F SAK3: n = 4). Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$  vs. vehicle-treated wild-type mice; #  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated NL-F mice.

### 3.1.5. NL-G-F マウスの認知機能障害は SAK3 の急性投与により改善される

次に、NL-G-F マウスに認められる認知機能障害に対する SAK3 とドネペジルの急性投与による改善作用を比較検討した。SAK3 (0.5 mg/kg) とドネペジル (1.0 mg/kg) を経口投与し、30 分後に行動試験によって認知機能を評価した (Fig. 4A)。Y 字迷路試験では、NL-G-F マウスに交替行動率の減少が認められたが ( $56.5 \pm 2.8\%$ ,  $p = 0.0037$  vs. WT + vehicle)、それは SAK3 の投与によって改善した ( $78.1 \pm 2.2\%$ ,  $p = 0.0006$  vs. NL-G-F + vehicle)。しかし、ドネペジルの投与では改善しなかった。なお、アームへの総進入回数についてはすべての群で変化は認められなかった (Fig. 4B, C)。新奇物体認識試験の training セッションでは、全ての群で有意な変化はなかった (Fig. 4D)。Test セッションでは、NL-G-F マウスに物体識別能力低下が認められたが、それは SAK3 の投与により改善した (WT + vehicle:  $63.1 \pm 2.5\%$ ,  $p = 0.0000071$  vs. Familiar; NL-G-F + SAK3:  $61.3 \pm 5.0\%$ ,  $p = 0.0099$  vs. Familiar; Fig. 4E)。一方、ドネペジルの投与では改善しなかった。受動的回避試験の training セッションでは、全群間で暗室への移動時間に有意な変化は認められなかった (Fig. 4F)。しかしながら、test セッションにおいては NL-G-F マウスにおいて暗室への移動時間に有意な減少が認められた ( $1110.8 \pm 33.2$  s,  $p = 0.0009$  vs. WT + vehicle; Fig. 4G)。この移動時間の減少は SAK3 の投与によって改善したが、ドネペジルの投与では改善しなかった ( $300.0 \pm 0$  s,  $p = 0.0008$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 4G)。

**A****B****C****D****E****F****G**

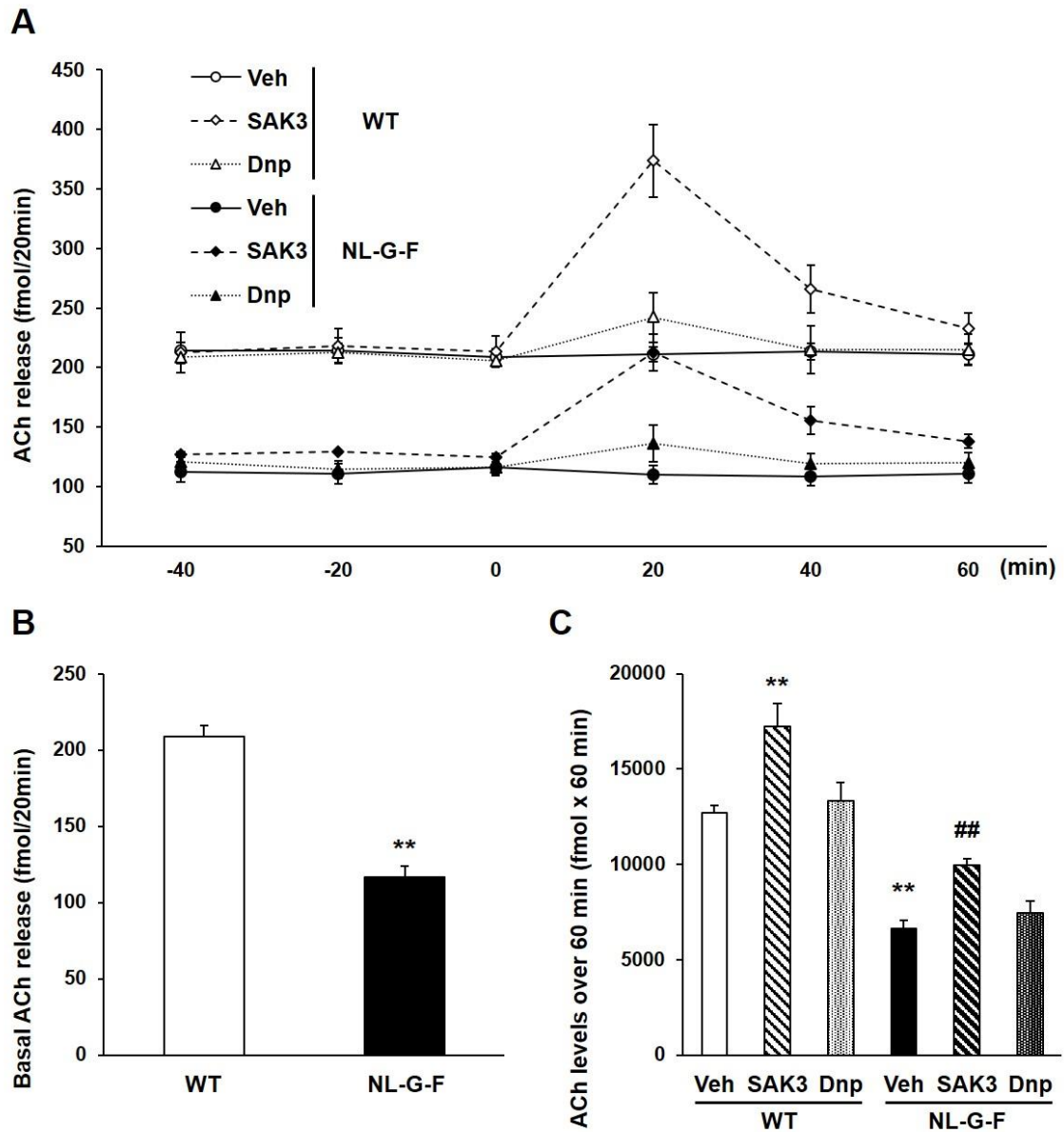
**Fig. 4. SAK3, but not donepezil acute administration ameliorates cognitive deficits in NL-G-F mice.** (A) Experimental schedule used in acute administration study. (B) Number of total arm entries and (C) alternations in a Y-maze task (n = 6-10 per group). Error bars represent SEM. \*\*p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice; ##p < 0.01 vs. vehicle-treated NL-G-F mice by one-way ANOVA with post hoc Dunnett test; F (3, 26) = 7.884, p < 0.01. Discrimination index of object exploration during (D) the trial session and (E) the test session in a novel object recognition task (n = 6-10 per group). Error bars represent SEM. \*\*p < 0.01 vs. the familiar group by Student's t-test. (F) Latency to enter the dark compartment in the training session and (G) test session of step-through passive avoidance task (n = 6-8 per group). F (3, 30) = 6.425, p < 0.01. Error bars represent SEM. \*p < 0.05 vs. vehicle-treated WT mice; ##p < 0.01 vs. vehicle-treated NL-G-F mice by one-way ANOVA with post hoc Dunnett test; F (3, 22) = 11.87, p < 0.01.

### 3.1.6. SAK3 の急性投与は NL-G-F マウスの海馬 CA1 領域における ACh 遊離の減少を改善する

当研究室では、SAK3 の急性投与が T-VGCCs の活性化を介して WT マウス及び AD モデルマウスである OBX マウスの海馬 CA1 領域における ACh 遊離を増加させることを報告している (Yabuki et al., 2017b)。そこで、本研究では SAK3 が NL-G-F マウスにおける ACh 遊離を促進するかについてマイクロダイアリシス法を用いて検討した。結果、全群間で有意な ACh 遊離の変化が認められた [ $F(5, 27) = 32.942, p < 0.0001$ ]。これまでの報告と同様に (Yabuki et al., 2017b)、SAK3 の急性投与 (0.5 mg/kg, p.o.) は WT マウスにおける ACh 遊離を有意に増強した (ACh levels for 60 min; vehicle-treated WT:  $12695.43 \pm 406.73$  fmol  $\times$  60 min; SAK3-treated WT:  $17255.92 \pm 1203.78$  fmol  $\times$  60 min,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT; Fig. 5A)。しかしながら、ドネペジルの急性投与 (Dnp: 1.0 mg/kg, p.o.) による ACh 遊離作用は、過去の報告と一致して有意ではなかった (Imaishi et al., 2012) (ACh levels for 60 min; Dnp-treated WT:  $13350.53 \pm 949.13$  fmol  $\times$  60 min,  $p > 0.05$  vs. vehicle-treated WT and  $p < 0.01$  vs. SAK3-treated WT; Fig. 5A)。興味深いことに、NL-G-F マウスの海馬 CA1 領域における基礎 ACh 遊離量は WT マウスと比較して有意に減少していた (vehicle-treated WT:  $209.15 \pm 6.44$  fmol/20 min; vehicle-treated NL-G-F:  $116.46 \pm 7.36$  fmol/20min,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT; Fig. 5B)。この減少した ACh の遊離は SAK3 の急性投与により WT マウスの基礎遊離量まで回復した。一方で、ドネペジルの投与ではこの改善は認められなかった (ACh levels for 60 min; vehicle-treated NL-G-F:  $6647.46 \pm 449.53$  fmol  $\times$  60 min; SAK3-treated NL-G-F:  $9979.45 \pm 334.12$  fmol  $\times$  60 min,  $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-G-F; Dnp-treated NL-G-F:  $7469.49 \pm 609.38$  fmol  $\times$  60 min,  $p > 0.05$  vs. vehicle-treated NL-G-F and  $p < 0.05$  vs. SAK3-treated NL-G-F; Fig. 5C)。これらの



結果により、SAK3 は WT マウスだけでなく、NL-G-F マウスの AD 病態下においても ACh の遊離を促進出来ることが示された。



**Fig. 5. Decreased ACh release in hippocampal CA1 region in NL-G-F mice was restored by acute oral administration of SAK3.** (A) Time zero means the point immediately before oral administration of vehicle or SAK3. ACh release was measured using HPLC-ECD analysis of dialysates every 20 min (n=5-6 per group). Error bars represent SEM. (B) Basal ACh release was measured using HPLC-ECD analysis of

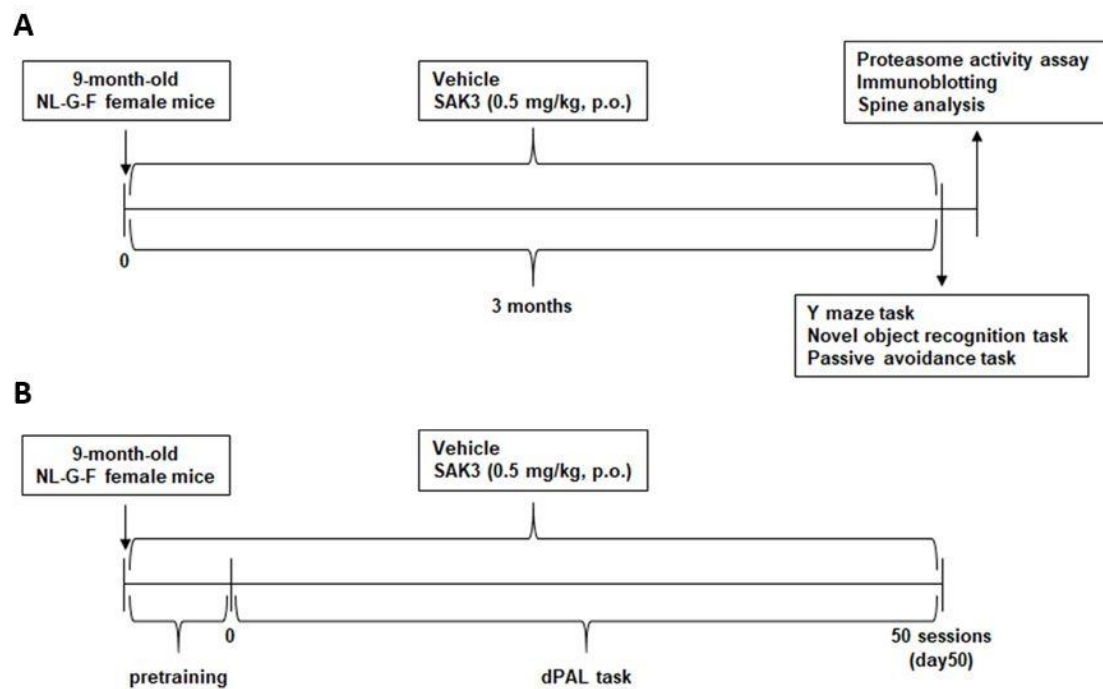
dialysate at time zero (n=5-6 per group). Error bars represent SEM. \*\*p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice. (C) Acute SAK3 administration (0.5 mg/kg, p.o.) promoted ACh release in hippocampal CA1 region in both WT and NL-G-F mice (n=5-6 per group). Error bars represent SEM. \*\*p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice; ##p < 0.01 vs. vehicle-treated NL-G-F KI mice.

### 3.2. SAK3 は CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性化により NL-G-F マウスのスパイン異常と認知機能障害を改善する

#### 3.2.1. SAK3 の慢性投与は NL-G-F マウスにおけるプロテアソーム活性の低下を改善する

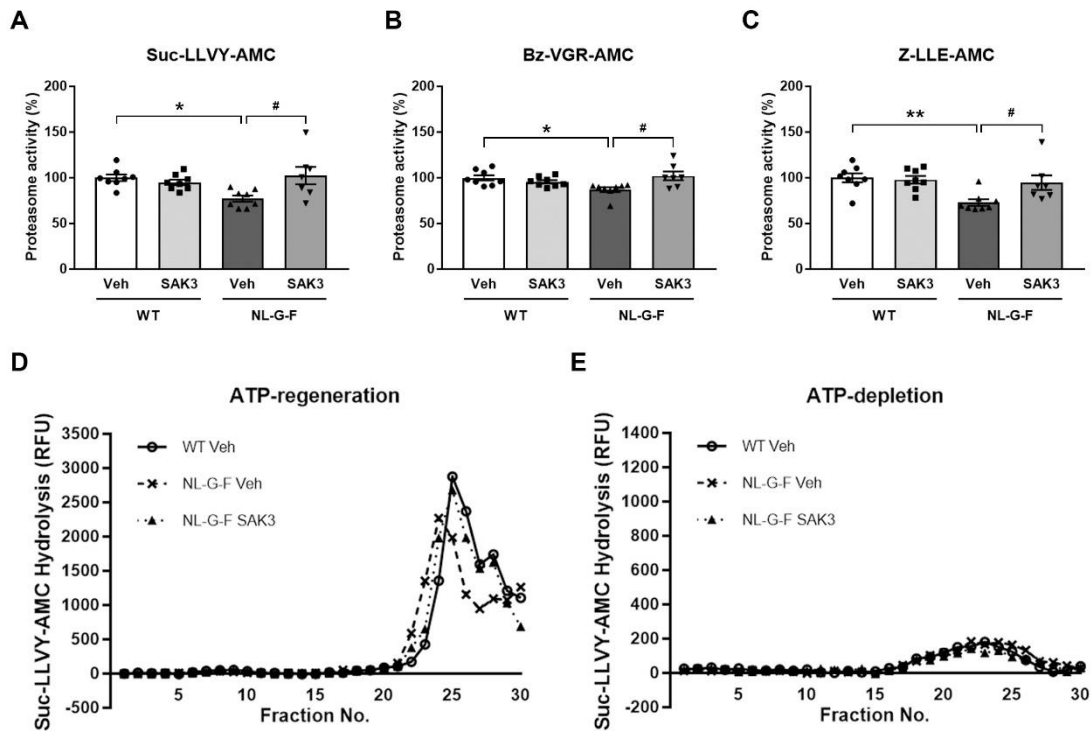
プロテアソームの活性が  $A\beta$  によって抑制されることが過去に報告されている (Gregori et al., 1995; Oh et al., 2005)。従って、まず初めにプロテアソームの活性が NL-G-F マウス脳内で低下しているかどうかをプロテアソームの 3 つの主要な活性を評価できる蛍光発生ペプチド (Suc-LLVY-AMC for chymotrypsin-like, Bz-VGR-AMC for trypsin-like, and Z-LLE-AMC for caspase-like activity) を用いて評価した。その結果、NL-G-F マウスの皮質領域では 3 種類全てのプロテアソームタンパク分解活性が低下していた (Suc-LLVY-AMC:  $77.3 \pm 3.4\%$ ,  $p = 0.0199$  vs. WT + vehicle; Bz-VGR-AMC:  $87.1 \pm 2.7\%$ ,  $p = 0.0292$  vs. WT + vehicle; Z-LLE-AMC:  $73.1 \pm 3.6\%$ ,  $p = 0.0051$  vs. WT + vehicle)。これらの活性低下は SAK3 の慢性投与により有意に改善した (Suc-LLVY-AMC:  $102.4 \pm 9.5\%$ ,  $p = 0.0118$  vs. NL-G-F + vehicle; Bz-VGR-AMC:  $102.1 \pm 4.7\%$ ,  $p = 0.0120$  vs. NL-G-F + vehicle; Z-LLE-AMC:  $94.7 \pm 8.0\%$ ,  $p = 0.0369$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 7A, B, C)。次に、グリセロール密度勾配法を用いて 26S プロテアソームと 20S プロテアソームの活性をそれぞれ評価した。ATP-regenerating system においては、26S プロテアソームの活性 (23-26 fractions) が NL-G-F マウスにおいて有意に減少していた。また、その減少は SAK3 の慢性投与によって改善した (Fig. 7D)。一方、ATP-depleting system においては、全ての群で 20S プロテアソームの活性に有意

な変化は認められなかった (Fig. 7E)。



**Fig. 6. Experimental schedule for chronic administration study using NL-G-F mice.**

(A) (B) Mice were separated into two groups for dPAL task and other experiments.



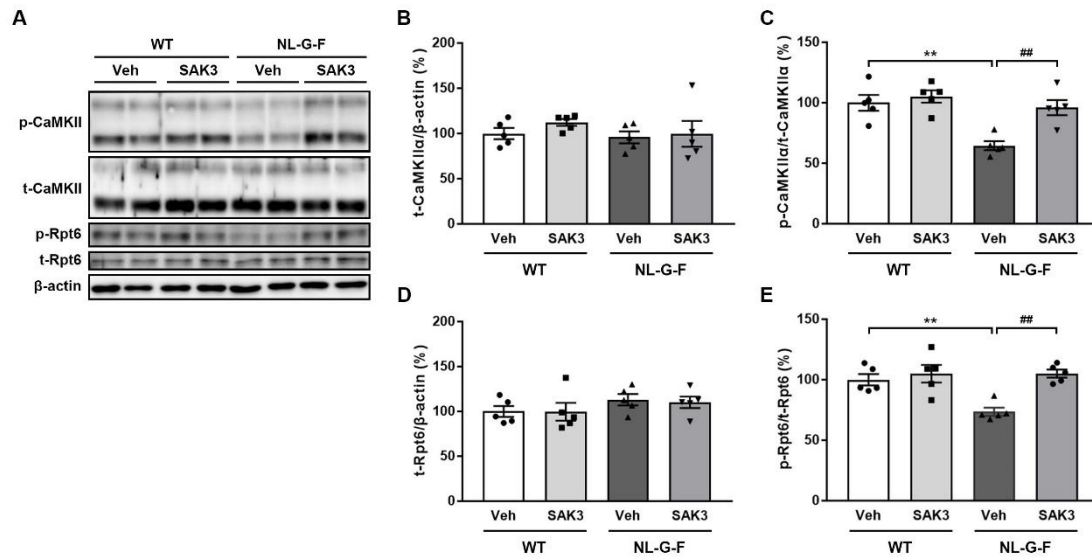
**Fig. 7. SAK3 administration rescues decreased proteasome activity in NL-G-F mice.**

(A) Proteasome activity assay by fluorogenic peptides, Suc-LLVY-AMC (chymotrypsin-like) and (B) Bz-VGR-AMC (trypsin-like) and (C) Z-LLE-AMC (caspase-like), using brain homogenate of cortex region (n = 7-8 per group); Suc-LLVY-AMC:  $F(3, 27) = 4.814$ ,  $p < 0.01$ ; Bz-VGR-AMC:  $F(3, 27) = 4.555$ ,  $p < 0.05$ ; Z-LLE-AMC:  $F(3, 27) = 5.795$ ,  $p < 0.01$ . (D) Brain homogenate of cortex region was incubated with ATP-regenerating system or (E) ATP-depletion system followed by fractionated by glycerol density gradient centrifugation. After fractionation, each fraction was used for proteasome activity assay using Suc-LLVY-AMC. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice; # $p < 0.05$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

### 3.2.2. SAK3 の慢性投与は NL-G-F マウスにおける CaMKII/Rpt6 シグナルの低下を改善する

CaMKII/Rpt6 シグナルはプロテアソーム活性の上昇に必要であることが過去に報告されている (Djakovic et al., 2009; Djakovic et al., 2012)。また、プロテインキナーゼ A (PKA) も Rpt6 の S120 残基をリン酸化することが知られているが、長期記憶の形成やスパインの成長に必要なプロテアソームの活性は PKA ではなく CaMKII によって調節されることが報告されている (Jarome et al., 2013; Hamilton et al., 2012)。加えて、当研究室では SAK3 が CaMKII の自己リン酸化レベルを増加させることを報告している (Yabuki et al., 2017b; Xu et al., 2018)。このことから、SAK3 の慢性投与が CaMKII の自己リン酸化 (T286) 及び Rpt6 のリン酸化 (S120) レベルを増加させるかどうか検討した。結果、CaMKII $\alpha$  及び Rpt6 のタンパク質量については全群間で有意な変化が認められなかった (Fig. 8A, B, D)。一方、CaMKII $\alpha$  の自己リン酸化 (T286) 及び Rpt6 のリン酸化レベルは NL-G-F マウスの海馬領域で WT マウスよりも有意に減少していた (autophosphorylated CaMKII $\alpha$ :  $64.6 \pm 3.7\%$ ,  $p = 0.0017$  vs. WT + vehicle; phosphorylated Rpt6:  $73.6 \pm 3.4\%$ ,  $p = 0.0080$  vs. WT + vehicle)。このリン酸化レベルの減少は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した (autophosphorylated CaMKII $\alpha$ :  $96.1 \pm 6.2\%$ ,  $p = 0.0048$  vs. NL-G-F + vehicle; phosphorylated Rpt6:  $105.1 \pm 3.3\%$ ,  $p = 0.0018$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 8A, C, E)。





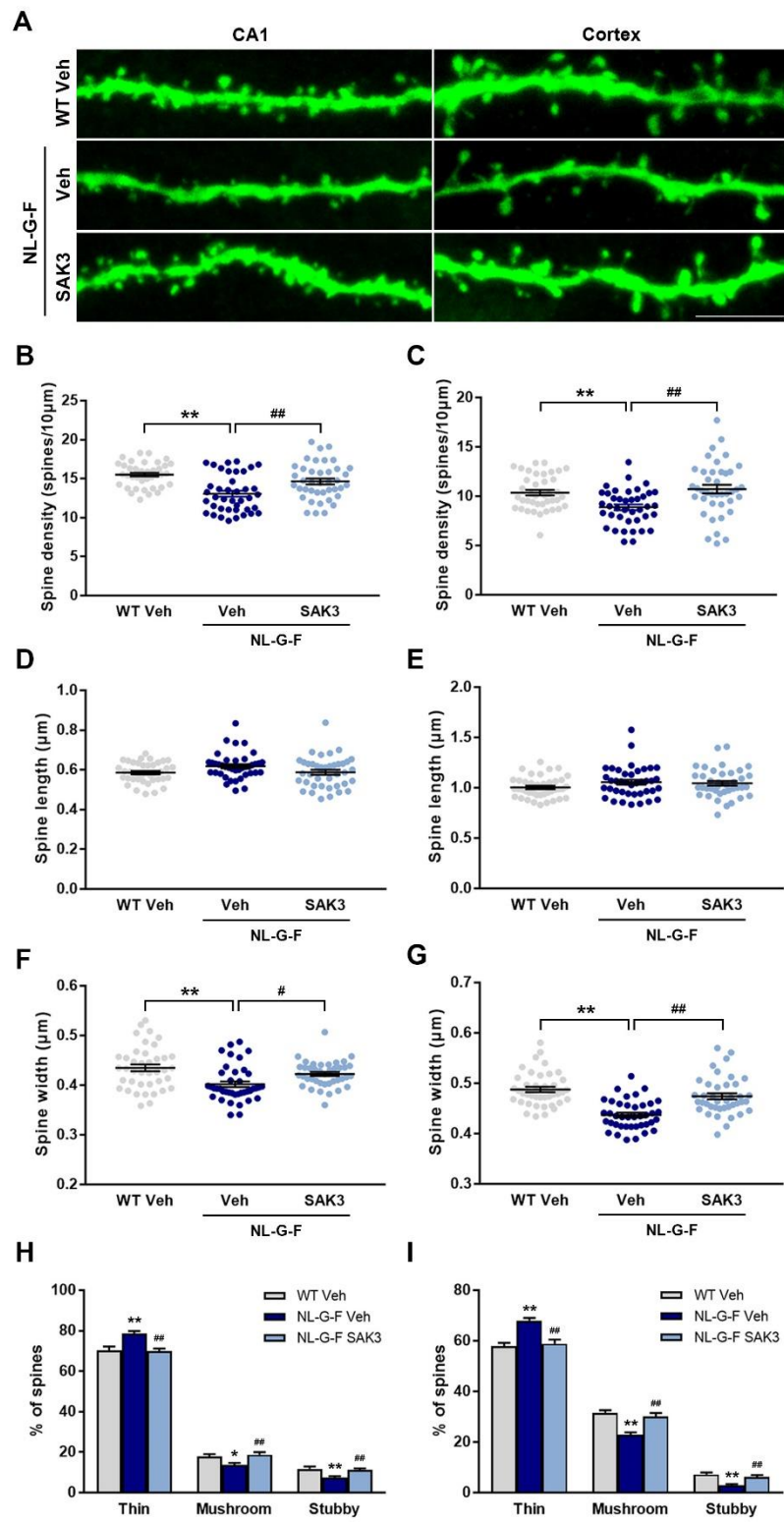
**Fig. 8. SAK3 administration improves CaMKII-Rpt6 signaling pathway in NL-G-F**

**mice.** (A) Representative image of western blots probed with antibodies against autophosphorylated CaMKII (T286), CaMKII, phosphorylated Rpt6 (S120), Rpt6, and  $\beta$ -actin in the hippocampus. (B) Quantitative analyses of CaMKII $\alpha$ , (C) autophosphorylated CaMKII $\alpha$  (T286), (D) Rpt6, and (E) phosphorylated Rpt6 (S129) protein levels (n = 5 per group); autophosphorylated CaMKII $\alpha$ :  $F(3, 16) = 11.01$ ,  $p < 0.01$ ; phosphorylated Rpt6:  $F(3, 16) = 9.316$ ,  $p < 0.01$ . Error bars represent SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice; ### $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

### 3.2.3. SAK3 の慢性投与は NL-G-F マウスのスパイン異常を改善する

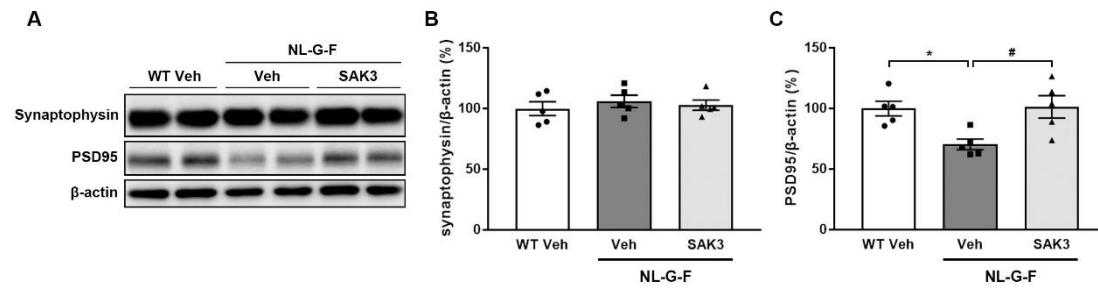
CaMKII による Rpt6 の S120 残基のリン酸化を介したプロテアソーム活性の上昇はシナプス可塑性の増強や新たなスパインの成長に寄与することが知られている (Djakovic et al., 2012; Hamilton et al., 2012)。従って、SAK3 の投与が NL-G-F マウスの皮質領域と海馬 CA1 領域におけるスパインの形成を促進するかについてルシファーイエロー法を用いて評価した。結果、NL-G-F マウスでは両領域において、樹状突起 10  $\mu$ L 毎のスパインの数が WT マウスと比べて有意に減少していた (CA1:  $13.1 \pm 0.38$ ,  $p < 0.0001$  vs. WT + vehicle; Cortex:  $8.9 \pm 0.29$ ,  $p = 0.0071$  vs. WT + vehicle; Fig. 9B, C)。このスパイン密度の減少は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した (CA1:  $14.7 \pm 0.37$ ,  $p < 0.0033$  vs. NL-G-F + vehicle; Cortex:  $10.7 \pm 0.43$ ,  $p = 0.0006$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 9B, C)。スパインの長さについては、WT マウスと比較して NL-G-F マウスで増加する傾向が認められたもののその差は有意ではなかった (Fig. 9D, E)。スパインの頭部の幅については、両領域において NL-G-F マウスで減少していたが (CA1:  $0.40 \pm 0.0057$ ,  $p = 0.0002$  vs. WT + vehicle; Cortex:  $0.44 \pm 0.0046$ ,  $p < 0.0001$  vs. WT + vehicle)、それは SAK3 の慢性投与によって改善された (CA1:  $0.42 \pm 0.0041$   $\mu$ m,  $p < 0.0319$  vs. NL-G-F + vehicle; Cortex:  $0.47 \pm 0.0059$ ,  $p < 0.0001$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 9F, G)。スパインの形態解析の結果、NL-G-F マウスでは未成熟型スパイン (thin 型) の増加と成熟型スパイン (mushroom 型と stubby 型) の減少が認められた (CA1 thin:  $78.7 \pm 1.2\%$ ,  $p = 0.0004$  vs. WT + vehicle; CA1 mushroom:  $13.8 \pm 0.90\%$ ,  $p = 0.0272$  vs. WT + vehicle; CA1 stubby:  $7.4 \pm 0.74\%$ ,  $p = 0.0027$  vs. WT + vehicle; Cortex thin:  $68.0 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.0001$  vs. WT vehicle; Cortex mushroom:  $22.9 \pm 0.87\%$ ,  $p < 0.0001$  vs. WT + vehicle; Cortex stubby:  $3.0 \pm 0.47\%$ ,  $p < 0.0001$  vs. WT + vehicle; Fig. 9H, I)。この未成熟型スパインの増加と成熟型スパインの減少は SAK3 の慢性投

与によって有意に改善した (CA1 thin:  $70.0 \pm 1.2\%$ ,  $p = 0.0002$  vs. NL-G-F + vehicle; CA1 mushroom:  $18.8 \pm 1.2\%$ ,  $p = 0.0052$  vs. NL-G-F+ vehicle; CA1 stubby:  $11.2 \pm 0.81\%$ ,  $p = 0.0098$  vs. NL-G-F + vehicle; Cortex thin:  $58.9 \pm 1.6\%$ ,  $p < 0.0001$  vs. NL-G-F vehicle; Cortex mushroom:  $30.1 \pm 1.4\%$ ,  $p < 0.0001$  vs. NL-G-F + vehicle; Cortex stubby:  $6.3 \pm 0.69\%$ ,  $p < 0.0014$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 9H, I)。



**Fig. 9. SAK3 administration ameliorates dendritic spine abnormality in NL-G-F mice.** (A) Representative images of dendrites in hippocampal CA1 and cortex (Scale bar, 5  $\mu$ m). (B) Spine density per 10  $\mu$ m dendritic length in hippocampal CA1 and (C) cortex (n = 40 dendrites from 4 mice per group); CA1:  $F(2, 117) = 13.67$ ,  $p < 0.01$ ; Cortex:  $F(2, 117) = 8.302$ ,  $p < 0.01$ . (D) Spine length in hippocampal CA1 and (E) cortex. (F) Spine width in hippocampal CA1 and (G) cortex; CA1:  $F(2, 117) = 8.526$ ,  $p < 0.01$ ; Cortex:  $F(2, 117) = 24.3$ ,  $p < 0.01$ . (H) The percentage of the type of spines in hippocampal CA1 and cortex; CA1 thin:  $F(2, 117) = 10.91$ ,  $p < 0.01$ ; CA1 mushroom:  $F(2, 117) = 5.77$ ,  $p < 0.01$ ; CA1 stubby:  $F(2, 117) = 6.843$ ,  $p < 0.01$ ; Cortex thin:  $F(2, 117) = 16.93$ ,  $p < 0.01$ ; Cortex mushroom:  $F(2, 117) = 18.14$ ,  $p < 0.01$ ; Cortex stubby:  $F(2, 117) = 11.73$ ,  $p < 0.01$ . More than 2,000 spines in hippocampal CA1 and more than 1,500 spines in cortex from 40 dendrites on 9-10 neurons from 4 mice per group were analyzed. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

NL-G-F マウスでスパイン密度の減少が認められたことから、プレシナプスのマーカーであるシナプトフィジン、ポストシナプスのマーカーである PSD95 の海馬でのタンパク発現量について評価した。シナプトフィジンのタンパク量については全群間で有意な変化はなかったものの (Fig. 10A, B)、PSD95 のタンパク量は NL-G-F マウスで有意に減少していた ( $70.4 \pm 4.4\%$ ,  $p = 0.0254$  vs. WT + vehicle; Fig. 10A, C)。この PSD95 の発現量の減少は SAK3 の慢性投与により有意に改善した ( $101.5 \pm 9.2\%$ ,  $p = 0.0194$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 10A, C)。



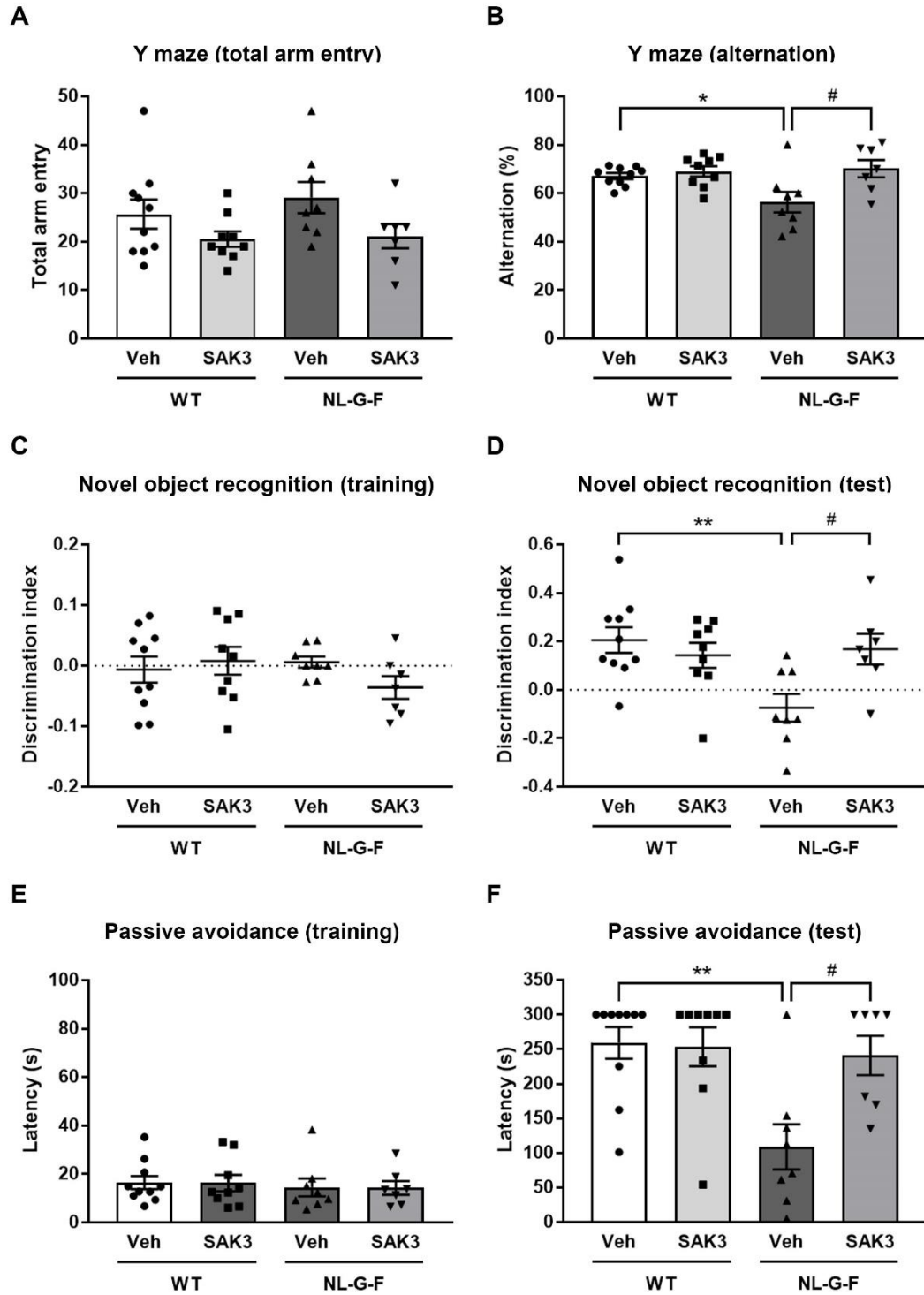
**Fig. 10. SAK3 administration rescues reduced PSD95 expression in NL-G-F mice.**

(A) Representative image of western blots probed with antibodies against synaptophysin, PSD95, and  $\beta$ -actin in the hippocampus. (B) Quantitative analyses of synaptophysin and (C) PSD95 protein levels ( $n = 5$  per group).  $F(2, 12) = 6.52$ ,  $p < 0.05$ . Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$  vs. vehicle-treated WT mice; # $p < 0.05$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

### 3.2.4. SAK3 の慢性投与は NL-G-F マウスの認知機能障害を改善する

NL-G-F マウスの認知機能障害が SAK3 の投与によって改善されるかを評価するために行動試験を行った。Y 字迷路試験では、NL-G-F マウスにおいて交替行動率の減少が認められた ( $54.9 \pm 3.2\%$ ,  $p = 0.0063$  vs. WT + vehicle)。この減少は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した ( $70.2 \pm 3.6\%$ ,  $p = 0.015$  vs. NL-G-F + vehicle)。なお、アームへの総進入回数については全群間で有意な変化はなかった (Fig. 11A and B)。新奇物体認識試験の training セッションでは、全ての群の間に有意な変化は認められなかった (Fig. 11C)。Test セッションでは、NL-G-F マウスに物体識別能力の低下が認められた ( $-0.074 \pm 0.057$ ,  $p = 0.0055$  vs. WT + vehicle; Fig. 11D)。この低下は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した ( $0.17 \pm 0.063$ ,  $p = 0.0351$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 11D)。受動的回避試験の training セッションでは、全群間で暗室への移動時間に有意な変化は見られなかった (Fig. 11E)。しかしながら、test セッションにおいては NL-G-F マウスにおいて暗室への移動時間に有意な減少が認められた ( $108.9 \pm 32.7$  s,  $p = 0.0027$  vs. WT + vehicle; Fig. 11F)。この移動時間の減少は SAK3 の慢性投与によって有意に改善した ( $240.9 \pm 28.4$  s,  $p = 0.0186$  vs. NL-G-F + vehicle; Fig. 11F)。



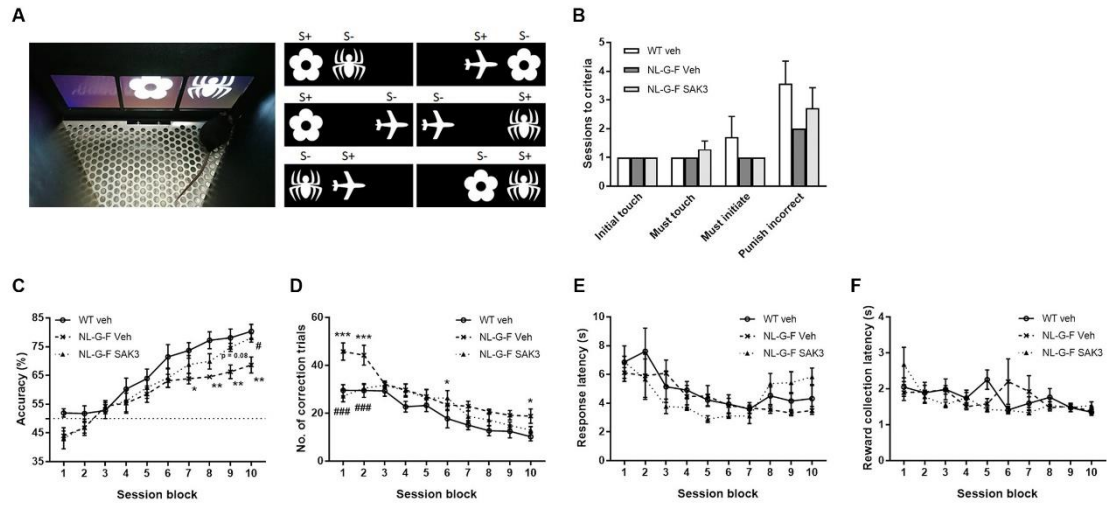


**Fig. 11. SAK3 administration ameliorates cognitive deficits in NL-G-F mice. (A)**

Number of total arm entries and (B) alternations in a Y-maze task (n = 7-10 per group).  $F(3, 30) = 7.678$ ,  $p < 0.01$ . (C) Discrimination index of object exploration during training session and (D) test session in a novel object recognition task (n = 7-10 per group).  $F(3, 30) = 4.98$ ,  $p < 0.01$ . (E) Latency to enter the dark compartment in the training session and (F) test session of step-through passive avoidance task (n = 7-10 per group).  $F(3, 30) = 6.425$ ,  $p < 0.01$ . Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle-treated WT mice; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

### 3.2.5. SAK3 の投与は NL-G-F マウスの dPAL 試験における成績を向上させる

SAK3 による認知機能改善効果をさらに確認するために dPAL 試験を行った。この試験では正解の位置と刺激を関連して覚えることが必要であり、高度な情報処理能力が必要とされる。dPAL 試験を開始する前に、タッチスクリーンに表示される刺激に触れることによって報酬が得られることをマウスに学習させるため、段階的なトレーニングを行った (Initial touch, Must touch, Must initiate, Punish incorrect)。すべてのトレーニングセッションにおいて、全群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 12B)。dPAL 試験では、NL-G-F マウスにおいて正解率の有意な低下が認められ、その低下は SAK3 の投与によって有意に改善した (2-way RM ANOVA shows a significant effect of session block:  $F(9, 162) = 71.04$ ,  $p < 0.0001$ , a significant effect of mice type:  $F(2, 18) = 4.028$ ,  $p = 0.036$ , no interaction:  $F(18, 162) = 1.502$ ,  $p = 0.095$ ; Fig. 12C)。また、NL-G-F マウスにはコレクショントライアル数の増加が認められ、dPAL 試験の成績の低下が示された。SAK3 の投与はこの増加を有意に低下させた (2-way RM ANOVA shows a significant effect of session block:  $F(9, 162) = 33.6$ ,  $p < 0.0001$ , a significant effect of mice type:  $F(2, 18) = 10.52$ ,  $p = 0.0009$ , a significant interaction effect:  $F(18, 162) = 2.244$ ,  $p = 0.0041$ ; Fig. 12D)。マウスが刺激に触れるまでの時間については全群間で有意な変化は認められなかった (2-way RM ANOVA shows a significant effect of session block:  $F(9, 162) = 10.61$ ,  $p < 0.0001$ , no effect of mice type:  $F(2, 18) = 0.1895$ ,  $p = 0.829$ , a significant interaction effect:  $F(18, 162) = 2.353$ ,  $p = 0.0025$ ; Fig. 12E)。さらに、マウスが報酬を獲得するまでの時間についても全群間に有意な差は見られなかった (2-way RM ANOVA shows a significant effect of session block:  $F(9, 162) = 3.46$ ,  $p < 0.0006$ , no effect of mice type:  $F(2, 18) = 0.2385$ ,  $p = 0.7903$ , a significant interaction effect:  $F(18, 162) = 1.955$ ,  $p = 0.015$ ; Fig. 12F)。



**Fig. 12. SAK3 administration rescues poor performance on dPAL task in NL-G-F mice.** (A) Photograph of a mouse performing the dPAL task in the screen operant chamber system and depictions of six trial types used in the task. (B) The number of sessions required to reach the criterion during the pretraining phase. ( $n = 7$  per group). (C) Accuracy, (D) number of correction trials, (E) response latency and (F) reward collection latency in the dPAL task. ( $n = 7$  per group). Each session block represents 5 testing sessions. Error bars represent SEM.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs. vehicle-treated WT mice;  $\#p < 0.05$ ,  $###p < 0.001$  vs. vehicle-treated NL-G-F mice.

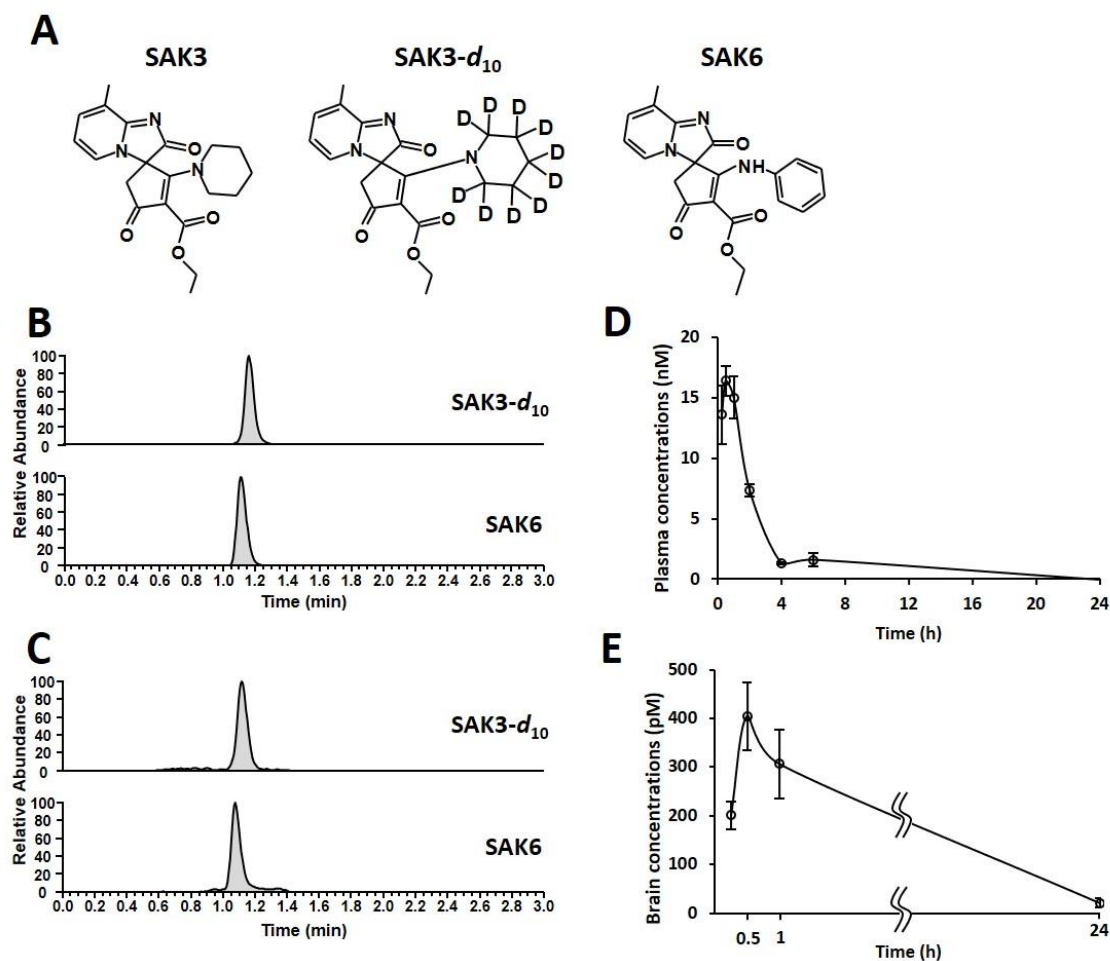
### 3.3. WT マウスと NL-G-F マウスにおける SAK3-d10 の体内動態 検討

#### 3.1.1. WT マウスと NL-G-F マウスにおける SAK3-*d*<sub>10</sub> の血中動態と脳内動態

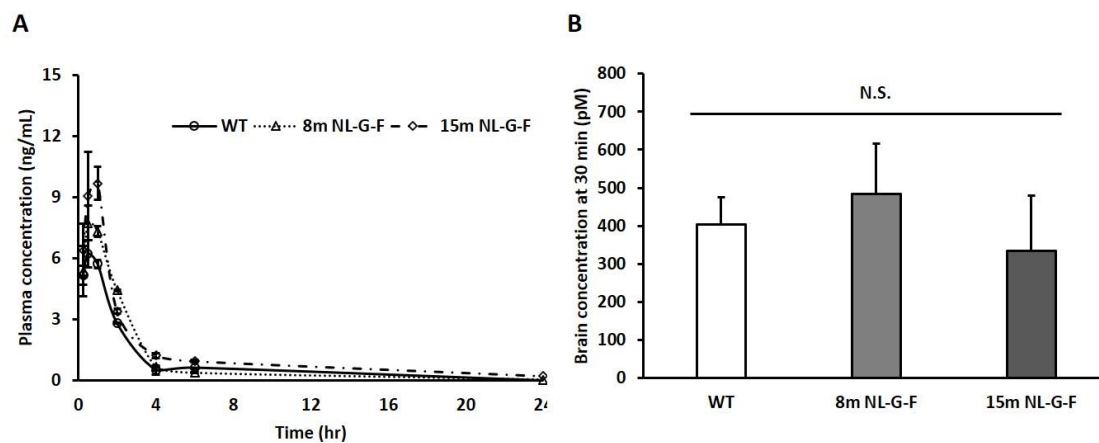
当研究室ではこれまでにさまざまな疾患モデルマウスを用いて SAK3 の認知機能改善作用を報告してきた (Yabuki et al., 2017b; Noreen et al., 2017; Yabuki et al., 2017a)。また、本研究においても AD モデルマウスを用いて SAK3 の認知機能改善作用を示したが、SAK3 が実際に血液脳関門 (BBB) を通過して脳内に移行することは実証されていない。SAK3 が確かに脳内において T-VGCCs を活性化していることを示すためにこの点を明らかにすることが必要である。従って、UPLC-MS/MS を用いて SAK3 の血漿中濃度及び脳内濃度を測定することによって、体内動態を検討することとした。しかしながら、SAK3 を投与していない脳サンプルにおいて SAK3 と同保持時間に夾雑ピークが認められ、低濃度域での正確な定量が困難であるという問題が生じたため (data not shown)、本検討では SAK3 の重水素同位体である SAK3-*d*<sub>10</sub> を代替品として用いることとした (structure shown in Fig. 13A)。血漿及び脳サンプルから得られた SAK3-*d*<sub>10</sub> と SAK6 のクロマトグラムを Fig. 13B, C に示した。血中動態検討では、SAK3-*d*<sub>10</sub> (0.5 mg/kg, p.o.) 投与後、0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 時間後に血液を採取し、UPLC-MS/MS によって濃度を測定した (Fig. 13D)。投与後、SAK3-*d*<sub>10</sub> は速やかに吸収されて最高濃度に達し ( $C_{\max}$ :  $17.8 \pm 1.8$  nM,  $t_{\max}$ :  $0.65 \pm 0.15$  h)、その後速やかに血中より消失した。続いて、SAK3-*d*<sub>10</sub> が脳内に移行していることを示すために、投与後 0.25, 0.5, 1, 24 時間後における脳内濃度を測定した (Fig. 13E)。血中濃度と同様に、SAK3-*d*<sub>10</sub> は投与後速やかに最高濃度に達した ( $C_{\max}$ :  $454.5 \pm$

66.4 pM,  $t_{\max}$ :  $0.70 \pm 0.12$  h)。

続いて、SAK3-*d*<sub>10</sub> の体内動態が AD 病態によって影響を受けるかについて 8 ヶ月齢と 15 ヶ月齢の NL-G-F マウスを用いて検討を行った。結果、全群間で血中動態に有意な変化は認められなかった (Fig. 14A)。また、投与 30 分後における脳内濃度についても全群間で有意な変化は見られなかった (Fig. 14B)。



**Fig. 13. Pharmacokinetics of SAK3-*d*<sub>10</sub> in mouse plasma and brain.** (A) Shown are chemical structures of SAK3 (left), SAK3-*d*<sub>10</sub> (middle), and SAK6 (right). (B) (C) Representative ion chromatogram of SAK3-*d*<sub>10</sub> and internal standard (SAK6) obtained from mouse plasma (B) and brain (C) samples. (D) Mean plasma concentration-time curve of SAK3-*d*<sub>10</sub> after oral administration of 0.5 mg/kg in mice (n = 5). (E) Mean brain concentration-time curve of SAK3-*d*<sub>10</sub> after oral administration of 0.5 mg/kg in mice (n = 5).



**Fig. 14. Pharmacokinetics of SAK3-*d*<sub>10</sub> in mouse plasma and brain.** (A) Mean plasma concentration-time curve of SAK3-*d*<sub>10</sub> after oral administration of 0.5 mg/kg in WT and NL-G-F mice (n = 4-5). (E) Mean brain concentration of SAK3-*d*<sub>10</sub> 30 min after oral administration of 0.5 mg/kg in WT and NL-G-F mice (n = 4-5).



## 4. 考察

本研究では、NL-F マウスと NL-G-F マウスを用いて SAK3 の急性及び慢性投与による AD 病態改善作用を明らかにした。NL-F マウスを用いた慢性投与実験では、投与開始時点の 9 ヶ月齢のマウスには顕著な認知機能障害が認められていないことから、SAK3 の AD に対する予防的効果を確認した。一方で、NL-G-F マウスを用いた急性及び慢性投与実験に関しては、8 ヶ月齢と 12 ヶ月齢のマウスの A $\beta$  病態は著しく進行しており、認知機能障害も現れていることから SAK3 の AD に対する治療的効果を示したと言える。すなわち、SAK3 は軽度認知障害 (MCI) を含む早期 AD の病状進行を防ぐことが出来るとともに、症状が著しく進行した後期の AD 患者を治療することが出来ると考えられる。

コリン神経の変性脱落は AD における病理学的特徴の一つである。NL-G-F マウスでは中隔野における ChAT 陽性ニューロンが減少していることが報告されている (Mehla et al., 2019)。中隔野における ACh 神経は海馬に投射しており、認知機能に重要な役割を果たしていることが知られている。これらの知見から、本研究で見られた NL-G-F マウス海馬 CA1 領域における基礎 ACh 遊離量の減少は中隔野から海馬に投射するコリン神経の障害が原因であると推察される。SAK3 の急性投与は NL-G-F マウス海馬 CA1 領域における ACh 遊離を WT マウスの基礎遊離量まで回復させ (Fig. 5)、認知機能障害を改善した (Fig. 4)。また、ドネペジルの急性投与ではこれらの作用は認められなかったことから、SAK3 は少なくとも急性投与による認知機能改善効果に関してはドネペジルよりも強力な作用を有していることを確認した。

本研究では、SAK3 の慢性投与によって NL-G-F マウス脳内におけるプロテアソーム活性の減少が改善されることを明らかにした (Fig. 7)。UPS は細胞内における主要なタンパク質分解経路であり (Schwartz and Ciechanover, 2009)、

UPS の機能異常は AD やパーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ハンチントン病 (HD) などといったさまざまな神経変性疾患と関連があることが知られている (Ciechanover and Brundin, 2003)。AD に関しては、患者の死後脳においてユビキチン化タンパク質の凝集が見られる (Perry et al., 1987; Mori et al., 1987)。また、AD 患者脳の海馬、上側頭回及び中側頭回、下頭頂小葉においてはプロテアソームの  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの発現量は変化することなく chymotrypsin 様及び PGPH 様のプロテアソーム活性が低下している (Keller et al., 2000)。また、*in vitro* での研究によってプロテアソームの活性が  $A\beta$  によって障害されることが示されており (Gregori et al., 1995; Oh et al., 2005)、中でも A11 抗体陽性の  $A\beta$  オリゴマーが特に強い阻害活性を有すると考えられる (Thibaut et al., 2018)。さらに、Tseng et al. (2008) は AD モデルマウスである 3 $\times$ Tg マウス脳内でプロテアソーム活性が低下していることを明らかにした。これらの報告と一致して、本研究では NL-G-F マウスの脳ホモジネートにおけるプロテアソームの活性減少を確認した (Fig. 7)。過去の報告では、 $A\beta$  は 20S プロテアソームに直接結合し、その基質ゲートをアロステリックに障害することによってプロテアソーム活性を阻害することが知られている (Thibaut et al., 2018)。しかしながら今回、グリセロール密度勾配法を用いた検討では、26S プロテアソームの活性に障害が認められたものの、20S プロテアソームの活性に変化は見られなかった (Fig. 7)。この理由として、実験操作の中で  $A\beta$  と 20S プロテアソームの結合状態が変化し、 $A\beta$  による 20S プロテアソームの活性阻害が無くなると推測した。26S プロテアソームは 20S プロテアソームと 19S 複合体によって構成される。19S サブユニットの構成成分の一つである Rpt6 のリン酸化は 26S プロテアソームの複合体形成を正に調節することが知られている (Sato et al., 2001)。また、CaMKII による Rpt6 の S120 残基のリン酸化に

よってプロテアソームの活性が上昇する (Djakovic et al., 2009; Djakovic et al., 2012)。Rpt6 の S120 残基のリン酸化を介してプロテアソーム活性を調節する分子としては CaMKII の他に PKA が報告されているが (Zhang et al., 2007)、興味深いことに、長期記憶を形成する際に扁桃体におけるプロテアソーム活性の調節を担うのは PKA ではなく CaMKII であることが示されている (Jarome et al., 2013)。さらに、PKA ではなく CaMKII による Rpt6 の S120 残基のリン酸化によるプロテアソームの活性上昇が新たなスパインの形成に必要であることが明らかとなっている (Hamilton et al., 2012)。これまでに、A $\beta$  による CaMKII の自己リン酸化の減少は多くの研究で報告されており (Zhao et al., 2004; Townsend et al., 2007; Min et al., 2013; Zhang et al., 2015)、このことから NL-G-F マウスの脳内では CaMKII/Rpt6 シグナルが低下していること示唆された。実際に、今回の検討によって NL-G-F マウス脳内における CaMKII の自己リン酸化 (T286) と Rpt6 のリン酸化 (S120) レベルの減少が明らかとなり、また SAK3 の投与はその減少を改善できることを示した (Fig. 8)。これらの結果から、SAK3 の慢性投与は CaMKII/Rpt6 シグナルの賦活化を介して 26S プロテアソームの活性を上昇させると考えられる。興味深いことに、AD 患者脳の中前頭回、下頭頂小葉、前帯状皮質において Rpt6 の発現量が減少しており、プロテアソーム活性も低下していることが報告されている (Alghamdi et al., 2017)。このことから、SAK3 の投与による Rpt6 のリン酸化レベルの上昇を介したプロテアソーム活性の改善は AD 治療において有益であることが示唆される。プロテアソームの活性が A $\beta$  で障害される一方で、A $\beta$  はプロテアソームによって分解されうる。In vitro の研究により、プロテアソームの阻害剤であるラクタマイシンとエポキシマイシンが A $\beta$  の分解を低下させることが示されている (Lopez-Salon et al., 2003)。また、3 $\times$ Tg マウスを用いた in vivo の研究では、エポキシマイシンの脳室内投

与により CA1 領域における細胞内の A $\beta$  蛍光強度が増大した。この時、APP やその C 末端フラグメントの量は変化していなかったことから、プロテアソームが直接 A $\beta$  を分解していることが示唆される (Tseng et al., 2008)。一方で、APP の代謝が UPS によって調節されるといった報告も存在する (Wang and Saunders, 2014)。本研究では、SAK3 の慢性投与が NL-F マウス脳内における A $\beta$  量を減少させることを示した。これまでの知見に基いて考えると、SAK3 の慢性投与による A $\beta$  沈着の減少はプロテアソームの活性上昇とそれに伴う分解の増加によって起こるものと推察される。しかしながら、活性化したプロテアソームが A $\beta$  を直接分解しているのか、もしくは APP の代謝を調節することによって A $\beta$  の産生量を低下させているのかについては不明である。

シナプスの異常は AD における病理学的特徴の一つであり、認知機能障害に関係することが知られている (Selkoe, 2002)。A $\beta$  の処置によって培養神経細胞や (Shankar et al., 2007; Freund et al., 2016) 急性脳スライスにおける (Smith et al., 2009) 樹状突起スパインの密度が減少する。また、さまざまな AD モデルマウスにおいて樹状突起スパインの減少が認められる (Smith et al., 2009; Bittner et al., 2010; Hongpaisan et al., 2011)。A $\beta$  オリゴマーによるスパインの減少は既にあるスパインがなくなるのではなく、新たなスパインの形成が抑制されることによって引き起こされることが報告されている (Zhao et al., 2017)。さらに、さまざまな AD モデルマウスにおける PSD95 の発現量の減少が示されている (Lee et al., 2011; Yang et al., 2015; Huang et al., 2018)。本研究で使用している NL-F マウスの海馬神経細胞においても、stromal interaction molecule 2 (STIM2) の発現量が減少することによって CaMKII の自己リン酸化レベルが減少し、結果として PSD95 の発現量と mushroom 型スパインの減少が起きることが明らかとなっている (Zhang et al., 2015)。本研究では、NL-G-F マウスにおいて PSD95 の発現

量 (Fig. 10) と樹状突起スパイン密度の減少 (Fig. 9) が観察された。また、スパインの形態解析によって、記憶に重要であるとされる成熟型スパイン (mushroom 型及び stubby 型) (Mahmmoud et al., 2015; McCann and Ross, 2017) が減少し、未成熟型のスパイン (thin 型) が増加していることを明らかにした (Fig. 9)。興味深いことに、シナプスの可塑性や長期記憶形成といった神経機能がプロテアソームの活性によって調節されることが報告されている (Fonseca et al., 2006; Lopez-Salon et al., 2001)。また、自己リン酸化 CaMKII $\alpha$  は足場タンパクとしてプロテアソームを樹状突起に誘導することや (Bingol et al., 2010)、CaMKII $\alpha$  による Rpt6 の S120 残基のリン酸化がプロテアソーム活性を増加させシナプスの可塑性を調節することが示されている (Djakovic et al., 2009; Djakovic et al., 2012)。S120 残基がリン酸化されない Rpt6 の変異体 (S120A) はラット海馬神経細胞において PSD95 によって染色されるシナプスへの集積が減少する。一方で、Rpt6 のリン酸化模倣変異体 (S120D) は海馬の樹状突起において Triton X-100 によって抽出されにくくなる。これらの結果は Rpt6 の S120 残基のリン酸化がスパイン画分に繋ぎ止められているプロテアソームを増加させることを示唆している (Bingol et al., 2010)。電気生理学的な検討では、Rpt6 の S120A 変異体及び S120D 変異体の発現が、mEPSC の頻度を変えることなく、その電圧に対して逆の影響を及ぼすことが示されており、Rpt6 の S120 残基のリン酸化を介したプロテアソーム活性の変化が神経の可塑性に関与していることが示唆されている (Djakovic et al., 2012)。さらに、CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性化は新たなスパインの形成に必要であることが報告されている (Hamilton et al., 2012)。プロテアソーム阻害剤、Rpt6 S120A 変異体、CAMKII 阻害剤はそのどれもが脳スライスの海馬錐体細胞における樹状突起スパインの新生を減少させる。また、ビククリンによって誘発されるスパインの新生もプロ

テアソーム阻害剤、NMDA 阻害剤、Rpt6 S120A 変異体によって減少することが示されており、神経活動依存的なスパインの形成が CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性によって調節されることが明らかとなっている。これらの報告から、本研究で明らかとなった NL-G-F マウスのスパイン異常に対する SAK3 の改善効果は CaMKII/Rpt6 シグナルの賦活化を介したプロテアソーム活性の増加によってもたらされるものと考えられ、また、このスパイン異常の改善が認知記憶障害の改善に寄与していることが推察される。

次に、SAK3 の慢性投与による AD 病態改善作用に関与している可能性のある遺伝子として *Sgkl* を見出した。マイクロアレイ解析と RT-qPCR 法を用いた検討から、NL-F マウスでは *Sgkl* 遺伝子が減少しており、SAK3 投与によってその減少が改善されることを明らかにした (Fig. 3)。*Sgkl* 遺伝子の発現はプロテインキナーゼ C (PKC) (Lang et al., 2000) や細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK1/2) (Mizuno and Nishida, 2001)、cAMP (Gonzalez-robayna et al., 2001) など様々なシグナル分子によって調節されることが知られている。また、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加によって SGK1 の転写が誘導されることも報告されている (Klingel et al., 2000)。Brickley et al. (2013) はタプシガルギン誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇によって引き起こされる SGK1 の誘導は calmodulin/CaMKII シグナルによって媒介されることを示した。このことから、SAK3 は CaMKII シグナルの調節を介して NL-F マウスにおける *Sgkl* mRNA の減少を改善している可能性が示唆される。SGK1 はセリン/スレオニンキナーゼの一種であり脳においては主に神経細胞に発現している (Wärntges et al., 2002)。SGK1 は  $\gamma$ -セクレターゼの構成タンパクであるニカストリンをリン酸化し、そのプロテアソームとリソソームによる分解を促進することによって  $\gamma$ -セクレターゼ依存性の APP 切断を抑制する (Mo et al., 2012)。また、SGK1 は APP に結合することが知られているア

ダブタータンパクである FE65 をリン酸化することによって BACE1 による APP の切断を減少させる (Chow et al., 2015)。SGK1 による FE65 のリン酸化は APP と FE65 の結合を阻害し、プロテアソームによる APP の分解を促進することで結果的に A $\beta$  産生を減少させる。また、海馬における SGK1 の活性は神経可塑性や空間記憶、恐怖記憶の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (Lang et al., 2006; Lee et al., 2003; Ma et al., 2006; Yang et al., 2011)。さらに近年、SGK1 を海馬で過剰発現させることによって APP/PS1 マウスの A $\beta$  沈着が抑制され、認知機能障害が改善されることが報告された (Lian et al., 2020)。これらの知見から、SAK3 投与による *Sgkl* 遺伝子発現の回復が NL-F マウスにおける AD 病態の改善に寄与している可能性が示唆される。

最後に、UPLC-MS/MS を用いた濃度測定によって SAK3-*d*<sub>10</sub> の血中及び脳内動態を確認した (Fig. 13)。SAK3-*d*<sub>10</sub> は投与後速やかに  $C_{\max}$  に達し、その後速やかに血中から消失した。脳内における  $C_{\max}$  は  $454.5 \pm 66.4$  pM であり、SAK3-*d*<sub>10</sub> が BBB を通過して脳へと移行することが示された。しかしながら、本検討では遊離型とタンパク質結合型の SAK-*d*<sub>10</sub> を分けて測定していないため、脳内における SAK-*d*<sub>10</sub> の濃度が T-VGCCs を活性化するのに十分であるかについては証明できていない。当研究室では電気生理学的手法を用いて、SAK3 が 100 pM-10 nM の濃度において ST101 よりも強力に TVGCCs を活性化することを明らかにしている (Yabuki et al., 2017b)。また、SAK3 は同用量 (0.5 mg/kg) の経口投与で ST101 よりも強力にマウス海馬における ACh 遊離を促進し、そしてその作用が T-VGCCs の特異的な阻害剤で阻害されることが示されている (Yabuki et al., 2017b)。さらに、同用量を投与した際の脳内濃度は SAK3-*d*<sub>10</sub> よりも ST101 の方が高いことも分かっている (data not shown)。これらの結果から、脳内における遊離型の SAK3-*d*<sub>10</sub> の濃度は ST101 よりも強力に T-VGCCs を

活性化できる 100 pM 以上の濃度に達していることが推察される。しかしながら、SAK3 と ST101 の ACh 遊離作用強度の差がそれぞれの薬物のタンパク質結合率の違いによる脳内遊離型薬物濃度の差から生じている可能性は否定できない。従って今後、マイクロダイアリシス法を用いて、脳内における遊離型の SAK3-*d*<sub>10</sub> 濃度を測定し、SAK3-*d*<sub>10</sub> が 確かに T-VGCCs を活性化出来る濃度に達していることを証明する必要がある。血中動態では、SAK3-*d*<sub>10</sub> は投与 24 時間後には血漿中から完全に消失していた。このことから、SAK3 は血中濃度をコントロールしやすく、投与スケジュールを組みやすい薬物であると考えられる。

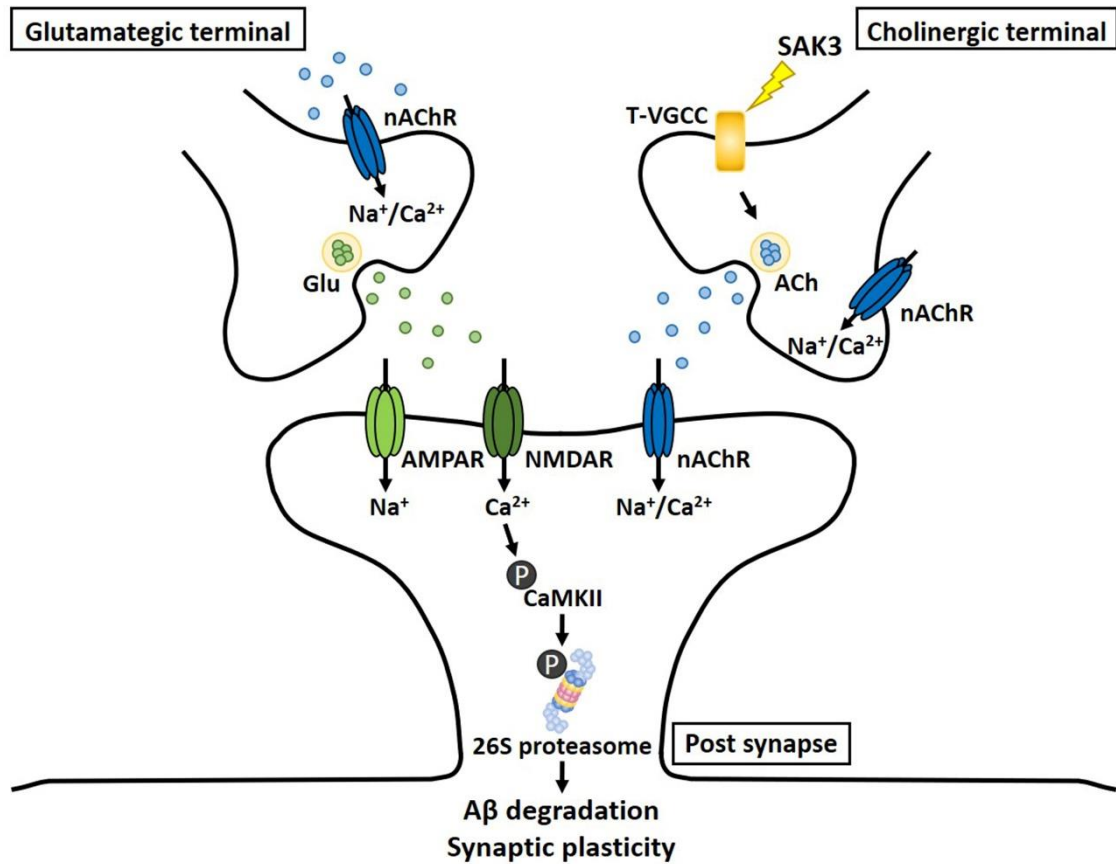
AD の病態下では BBB が崩壊することが多くの研究で報告されている。血管における A $\beta$  の沈着は炎症反応や細胞毒性を惹起し、AD 脳における BBB の透過性の増大を引き起こす (Roher et al., 2003; Carrano et al., 2011; Erickson and Banks, 2013)。脳アミロイドアンギオパチー (ACC) により平滑筋細胞、内皮細胞、周皮細胞が変性し、BBB が障害される (Erickson and Banks, 2013)。P-glycoprotein (P-gp) (encoded by ABCB1) は薬物の脳における薬効を制限する ATP 依存性の排出トランスポーターであり、BBB における重要な構成要素であることが知られている。P-gp によって認識され、排出される基質は幅広く、分子量は 250-4000、また基質が有する構造的・化学的性質も多様である (aromatic, nonaromatic, linear, circular, hydrophobic, basic, uncharged, zwitterionic, negatively charged) (Kerns and Di, 2008; Miller et al., 2008)。また、水素結合受容基 (N and O) が多く存在する化合物は P-gp の基質になりやすいことが知られている (Raub, 2006, Kerns and Di, 2008)。SAK3 は疎水性領域を持っており、また水素結合受容基も比較的多いことから P-gp の基質となる可能性があり、それによって脳への移行が制限されている可能性が考えられる。P-gp の発現や活性は AD の病態下において変化することが報告されている。AD モデルマウスである Tg2576 マ



ウスから単離された脳毛細血管では WT マウスと比較して P-gp の活性が 70% 低下しており、また発現量も 60% 減少していることが示されている (Hartz et al., 2010)。また、AD 患者では毛細血管における老人斑の密度と P-gp の発現が負の相関を示すことが明らかとなっている (Vogelgesang et al., 2002)。P-gp 以外に BBB において脳への薬物の移行を制限する排出トランスポーターとしては Breast cancer resistance protein (BCRP) (encoded by ABCG2) がよく知られている。BCRP の基質群は P-gp の基質群とかなりオーバーラップしており、このことから SAK3 は BCRP の基質にもなる可能性が示唆される。P-gp とは対照的に、BCRP の発現量は AD モデルマウスである 3×Tg マウスや AD/ACC の患者では増加していることが報告されている (Xiong et al., 2009)。これらの知見から、SAK3-*d*<sub>10</sub> が P-gp と BCRP の基質であるならば、NL-G-F マウスの AD 病態による両トランスポーターの発現・活性の変化に伴って SAK3-*d*<sub>10</sub> の脳内濃度が変わることが推測された。しかしながら実際には、NL-G-F マウスにおける SAK3-*d*<sub>10</sub> の脳内濃度は 15 ヶ月齢の段階においても WT マウスと変わらなかった (Fig. 14)。この結果は、NL-G-F マウスでは BBB の密着結合が崩壊していないことを示唆している。また、NL-G-F マウスにおいて SAK3-*d*<sub>10</sub> の脳内濃度が変化しなかった理由として以下の 3 つを考えた。まず一つ目として、P-gp と BCRP の発現・活性が NL-G-F マウスにおいて変化していないことが考えられる。次に、P-gp の発現・活性は減少しているが、対照的に BCRP の発現が増加していることによって P-gp による排出の低下が補われ、結果として脳内濃度が変わらなかった可能性がある。最後に、SAK3-*d*<sub>10</sub> は両トランスポーターの基質ではなく、単純拡散によってのみ脳へと移行する可能性が考えられる。SAK3 がこれらのトランスポーターの基質となるのかについて明らかにすることは脳内における SAK3 の薬効を保証する上で非常に重要な点である。従って、

この点を解明するための更なる検討が必要とされる。

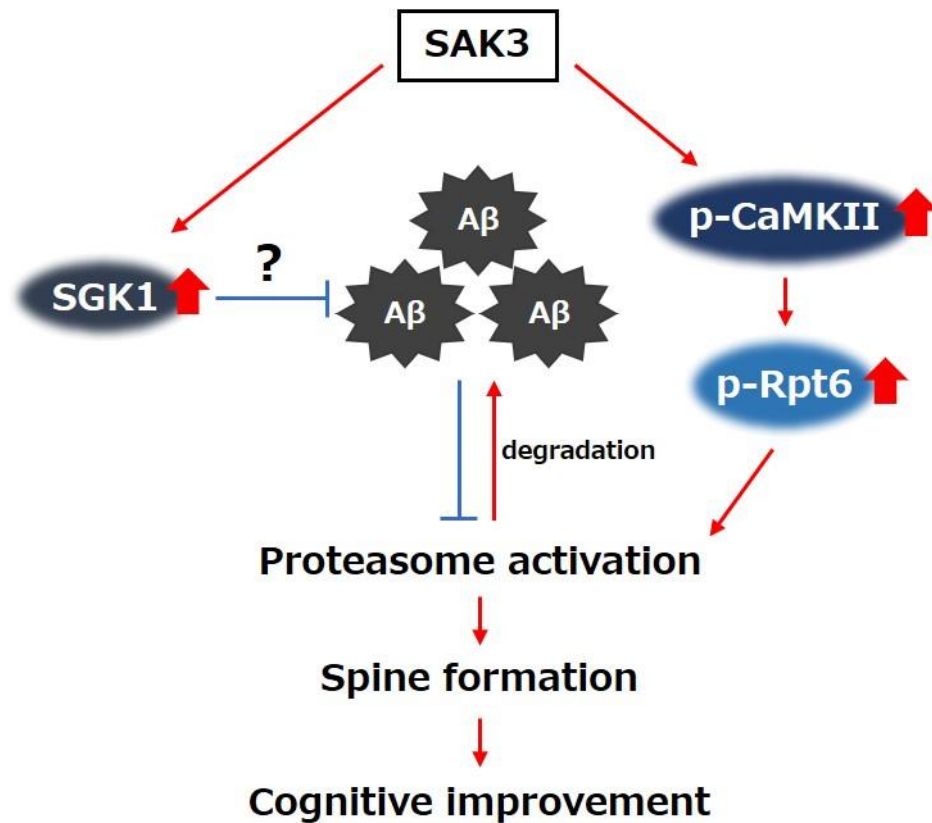
SAK3 の投与は認知機能障害やシナプスの異常、 $A\beta$  の沈着といった AD 病態を改善した。当研究室では、SAK3 が T-VGCCs のうち Cav3.1 と Cav3.3 の電流を増強することを報告している (Yabuki et al., 2017b)。興味深いことに、Cav3.1 及び Cav3.3 電流はスパインの形成に寄与しており、 $A\beta$  オリゴマーがこれを阻害することが報告されている。この  $A\beta$  による Cav3 電流の阻害は  $A\beta$  の Nogo receptor family 1 (NgR1) への結合を介した Rho kinase (ROCK) シグナルの活性化によって引き起こされることが示されている (Zhao et al., 2017)。このことから、SAK3 による Cav3.1 と Cav3.3 電流の増強を介したスパイン異常の改善は  $A\beta$  のシナプス毒性に対する理にかなった治療戦略であると言える。SAK3 の投与は T-VGCCs の活性化を介してマウス海馬における ACh 遊離を促進する (Yabuki et al., 2017b)。また今回、NL-G-F マウスにおいても ACh の遊離を増強させることを示した。この ACh の遊離促進によってポストシナプスに存在する nAChR と NMDAR が活性化され、CaMKII/Rpt6 シグナルが賦活化された結果、プロテアソームの活性が増加したと考えられる。活性化したプロテアソームはスパイン形成の改善や  $A\beta$  沈着の抑制に寄与していることが推察される (Fig. 15)。



**Fig. 15. Schematic depicting of the mechanism underlying the therapeutic effects of SAK3 administration for AD pathology.** SAK3 stimulates T-type calcium channels at cholinergic terminal, triggering intracellular calcium influx, followed by promotes ACh release. Released ACh stimulate nAChR at glutamatergic terminal, facilitating Glu release. A potentiation of CaMKII/Rpt6 signaling through nAChR and NMDAR activation contributes to the increasing in proteasomal activity. Elevated proteasomal activity may account for Aβ degradation and synaptic plasticity.

## 5. 結論

本研究ではまず初めに、SAK3 の急性及び慢性投与が NL-F と NL-G-F マウスの認知機能障害を改善することを明らかにした。また、SAK3 の慢性投与は AD の病理学的特徴の一つである A $\beta$  の沈着を抑制した。さらに、マイクロアレイ解析と RT-qPCR 法によって、SGK1 が SAK3 の薬効発現に関与している可能性を示した。急性投与実験では、NL-G-F マウス海馬における ACh 遊離を増強することを示した。結果の後半では、NL-G-F マウス脳内において CaMKII/Rpt6 シグナルの低下によるプロテアソーム活性の減少が起きていることを明らかにした。また、SAK3 の投与はこのプロテアソームの活性低下を回復させ、その結果としてスパイン異常を改善し、A $\beta$  沈着を抑制したと考えられる (Fig. 16)。本研究によって、CaMKII/Rpt6 シグナルを介したプロテアソームの活性化は認知機能障害の改善と A $\beta$  沈着の抑制を同時に達成できる AD の新たな治療戦略であることが示され、さらに SAK3 がそれらの作用を有する新たな疾患修飾薬であることが明らかとなった。



**Fig. 16. Schematic depicting of the signaling pathway involved in the therapeutic effects by SAK3 treatment against AD pathology.** Chronic SAK3 treatment increases proteasome activity via improving CaMKII/Rpt6 signaling, which may contribute to the inhibition of A $\beta$  deposition and amelioration of spine abnormalities, followed by cognitive improvement. Chronic SAK3 administration also increases SGK1 mRNA expression, but detailed involvement of SGK1 in the therapeutic effects of SAK3 for AD pathology remains unclear.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野 福永浩司 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、有益なご助言と貴重なご協力を頂きました当教室の皆様に心からお礼申し上げます。

最後に、本論文を御高閲賜りました東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 平澤典保 教授、薬物送達学分野 内田康雄 講師に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Abe, T., Kakehi, A., Suga, H., Okumura, Y., Itoh, K., 2010. Synthesis of spiro[2-cyclopentene-1,3'-imidazo[1,2-a]-pyridine] derivatives and their interesting behavior in <sup>1</sup>H-NMR spectra in deuteriochloroform. *Heterocycles* 81, 2075–2086. doi:10.3987/COM-10-11985
- Alghamdi, A., Vallortigara, J., Howlett, D.R., Broadstock, M., Hortobágyi, T., Ballard, C., Thomas, A.J., O'Brien, J.T., Aarsland, D., Attems, J., Francis, P.T., Whitfield, D.R., 2017. Reduction of RPT6/S8 (a Proteasome Component) and Proteasome Activity in the Cortex is Associated with Cognitive Impairment in Lewy Body Dementia. *J. Alzheimers. Dis.* 57, 373–386. doi:10.3233/JAD-160946
- Altier, C., Zamponi, G.W., 2004. Targeting Ca<sup>2+</sup> channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol. Sci.* doi:10.1016/j.tips.2004.07.004
- Alzheimer's Association, 2017. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 13, 325–373. doi:10.1016/j.jalz.2017.02.001
- Bingol, B., Wang, C.F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., Sheng, M., 2010. Autophosphorylated CaMKII $\alpha$  Acts as a Scaffold to Recruit Proteasomes to Dendritic Spines. *Cell* 140, 567–578. doi:10.1016/j.cell.2010.01.024
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S.M., Hoffmann, N., Mitteregger, G.,

- Kretschmar, H., Laferla, F.M., Herms, J., 2010. Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLoS One* 5, 1–9.  
doi:10.1371/journal.pone.0015477
- Blesneac, I., Chemin, J., Bidaud, I., Huc-Brandt, S., Vandermoere, F., Lory, P., 2015. Phosphorylation of the Cav3.2 T-type calcium channel directly regulates its gating properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13705–13710.  
doi:10.1073/pnas.1511740112
- Braak, H., Braak, E., 1991. Acta H ' pathologica Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol.*
- Brickley, D.R., Agyeman, A.S., Kopp, R.F., Hall, B.A., Harbeck, M.C., Belova, L., Volden, P.A., Wu, W., Roe, M.W., Conzen, S.D., 2013. Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) is regulated by store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and mediates cytoprotection against necrotic cell death. *J. Biol. Chem.* 288, 32708–32719. doi:10.1074/jbc.M113.507210
- Bussière, T., Bard, F., Barbour, R., Grajeda, H., Guido, T., Khan, K., Schenk, D., Games, D., Seubert, P., Buttini, M., 2004. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am. J. Pathol.* 165, 987–995.



doi:10.1016/S0002-9440(10)63360-3

Carrano, A., Hoozemans, J.J.M., Van Der Vies, S.M., Rozemuller, A.J.M., Van

Horssen, J., De Vries, H.E., 2011. Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 1167–1178. doi:10.1089/ars.2011.3895

Chow, W.N.V., Ngo, J.C.K., Li, W., Chen, Y.W., Tam, K.M.V., Chan, H.Y.E., Miller,

C.C.J., Lau, K.F., 2015. Phosphorylation of FE65 Ser610 by serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 modulates Alzheimer's disease amyloid precursor protein processing. *Biochem. J.* 470, 303–317. doi:10.1042/BJ20141485

Ciechanover, A., Brundin, P., 2003. The ubiquitin proteasome system in

neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(03)00606-8

Ciechanover, A., Kwon, Y.T. a., 2015. Degradation of misfolded proteins in

neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* 47, e147. doi:10.1038/emm.2014.117

Craig, P.J., Beattie, R.E., Folly, E.A., Banerjee, M.D., Reeves, M.B., Priestley, J. V.,

Carney, S.L., Sher, E., Perez-Reyes, E., Volsen, S.G., 1999. Distribution of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha(1G)$  subunit mRNA and protein throughout

the mature rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2949–2964. doi:10.1046/j.1460-

9568.1999.00711.x

Djakovic, S.N., Marquez-Lona, E.M., Jakawich, S.K., Wright, R., Chu, C., Sutton,

M.A., Patrick, G.N., 2012. Phosphorylation of Rpt6 regulates synaptic strength in

hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 32, 5126–5131.

doi:10.1523/JNEUROSCI.4427-11.2012

Djakovic, S.N., Schwarz, L.A., Barylko, B., DeMartino, G.N., Patrick, G.N., 2009.

Regulation of the proteasome by neuronal activity and calcium/calmodulin-

dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 284, 26655–26665.

doi:10.1074/jbc.M109.021956

Erickson, M.A., Banks, W.A., 2013. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and

consequence of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1500–1513.

doi:10.1038/jcbfm.2013.135

Fonseca, R., Vabulas, R.M., Hartl, F.U., Bonhoeffler, T., Nägerl, U.V., 2006. A Balance

of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the

Maintenance of LTP. *Neuron* 52, 239–245. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.015

Freund, R.K., Gibson, E.S., Potter, H., Dell'Acqua, M.L., 2016. Inhibition of the motor

protein Eg5/kinesin-5 in amyloid b-mediated impairment of hippocampal long-

term potentiation and dendritic spine loss. *Mol. Pharmacol.* 89, 552–559.

doi:10.1124/mol.115.103085

Fukunaga, K., Goto, S., Miyamoto, E., 1988. Immunohistochemical Localization of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Rat Brain and Various Tissues. *J. Neurochem.* 51, 1070–1078. doi:10.1111/j.1471-4159.1988.tb03070.x

Gangarossa, G., Laffray, S., Bourinet, E., Valjent, E., 2014. T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 92. doi:10.3389/fnbeh.2014.00092

Gauthier, S., Rountree, S., Finn, B., LaPlante, B., Weber, E., Oltersdorf, T., 2015. Effects of the Acetylcholine Release Agent ST101 with Donepezil in Alzheimer's Disease: A Randomized Phase 2 Study. *J. Alzheimer's Dis.* 48, 473–481. doi:10.3233/JAD-150414

Gonzalez-robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S., R, C.B.I.J.G., 200AD. Follicle-Stimulating Hormone ( FSH ) Stimulates Phosphorylation and Activation of Protein Kinase B ( PKB / Akt ) and Serum and ( Sgk ): Evidence for A Kinase- Independent Signaling by FSH in Granulosa Cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 1283–1300.

- Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M.E., Van Nostrand, W.E., Goldgaber, D.,  
1995. Amyloid  $\beta$ -protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro.  
J. Biol. Chem. doi:10.1074/jbc.270.34.19702
- Hamilton, A.M., Oh, W.C., Vega-Ramirez, H., Stein, I.S., Hell, J.W., Patrick, G.N.,  
Zito, K., 2012. Activity-Dependent Growth of New Dendritic Spines Is Regulated  
by the Proteasome. *Neuron* 74, 1023–1030. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.031
- Han, F., Shioda, N., Moriguchi, S., Yamamoto, Y., Raie, A.Y.A., Yamaguchi, Y., Hino,  
M., Fukunaga, K., 2008. Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one  
(ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory  
impairment by activating  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse  
hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 127–34. doi:10.1124/jpet.108.137471
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress  
and problems on the road to therapeutics. *Science* (80-. ). 297, 353–356.  
doi:10.1126/science.1072994
- Hartz, A.M.S., Miller, D.S., Bauer, B., 2010. Restoring blood-brain barrier P-  
glycoprotein reduces brain amyloid- $\beta$  in a mouse model of Alzheimer's disease.  
*Mol. Pharmacol.* 77, 715–723. doi:10.1124/mol.109.061754
- Hongpaisan, J., Sun, M.K., Alkon, D.L., 2011. PKC  $\epsilon$  activation prevents synaptic loss,

- A $\beta$  elevation, and cognitive deficits in alzheimer's disease transgenic mice. *J. Neurosci.* 31, 630–643. doi:10.1523/JNEUROSCI.5209-10.2011
- Horner, A.E., Heath, C.J., Hvoslef-Eide, M., Kent, B.A., Kim, C.H., Nilsson, S.R.O., Alsjö, J., Oomen, C.A., Holmes, A., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2013. The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nat. Protoc.* 8, 1961–1984. doi:10.1038/nprot.2013.122
- Huang, M., Liang, Y., Chen, H., Xu, B., Chai, C., Xing, P., 2018. The Role of fluoxetine in activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and repressing  $\beta$ -amyloid production in an Alzheimer mouse model. *Front. Aging Neurosci.* 10, 1–13. doi:10.3389/fnagi.2018.00164
- Huang, Y., Mucke, L., 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148, 1204–1222. doi:10.1016/j.cell.2012.02.040
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C., 2000. Identification of the major A $\beta$ 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6, 143–150. doi:10.1038/72237
- Jarome, T.J., Kwapis, J.L., Ruenzel, W.L., Helmstetter, F.J., 2013. CaMKII, but not

protein kinase A, regulates Rpt6 phosphorylation and proteasome activity during the formation of long-term memories. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 1–9.

doi:10.3389/fnbeh.2013.00115

Kalaria, R.N., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J.A., Ogunniyi, A., Perry, E.K., Potocnik, F., Prince, M., Stewart, R., Wimo, A., Zhang, Z.X., Antuono, P., 2008. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.* 7, 812–826. doi:10.1016/S1474-4422(08)70169-8

Keller, J.N., Hanni, K.B., Markesbery, W.R., 2000. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 75, 436–439. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x

Kerns, E.H., Di, L., 2008. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods, Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. Elsevier Inc.

Klingel, K., Wärntges, S., Bock, J., Wagner, C. a, Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R., Lang, F., 2000. Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G998–G1002.

Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., Vallon, V.,

2006. (Patho)physiological Significance of the Serum- and Glucocorticoid-

Inducible Kinase Isoforms. *Physiol. Rev.* 86, 1151–1178.

doi:10.1152/physrev.00050.2005

Lang, F., Klingel, K., Wagner, C. a, Stegen, C., Warntges, S., Friedrich, B.,

Lanzendorfer, M., Melzig, J., Moschen, I., Steuer, S., Waldegger, S., Sauter, M.,

Paulmichl, M., Gerke, V., Risler, T., Gamba, G., Capasso, G., Kandolf, R., Hebert,

S.C., Massry, S.G., Broër, S., 2000. Deranged transcriptional regulation of cell-

volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

*S. A.* 97, 8157–62. doi:97/14/8157 [pii]

Lee, E.H.Y., Hsu, W.L., Ma, Y.L., Lee, P.J., Chao, C.C., 2003. Enrichment enhances

the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial

learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2842–

2852. doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03032.x

Lee, H.G., Won, S.M., Gwag, B.J., Lee, Y.B., 2011. Microglial P2X7 receptor

expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP

*swe* /PS1dE9 mouse model of alzheimer's disease. *Exp. Mol. Med.* 43, 7–14.

doi:10.3858/emm.2011.43.1.001

Lee, Sukchan, Ahmed, T., Lee, Soojung, Kim, H., Choi, S., Kim, D.S., Kim, S.J., Cho,

- J., Shin, H.S., 2012. Bidirectional modulation of fear extinction by mediodorsal thalamic firing in mice. *Nat. Neurosci.* 15, 308–314. doi:10.1038/nn.2999
- Lian, B., Lan, Z., Sun, T., Meng, Z., Chang, Q., Liu, Z., Zhang, J., Zhao, C., 2020. Hippocampal overexpression of SGK1 ameliorates spatial memory, rescues A pathology and actin cytoskeleton polymerization in middle-aged APP/PS1 mice. *Behav. Brain Res.* 112503. doi:10.1016/j.bbr.2020.112503
- Lokireddy, S., Kukushkin, N.V., Goldberg, A.L., 2015. cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E7176–E7185. doi:10.1073/pnas.1522332112
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M.R.M., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., Pasquini, J.M., Medina, J.H., 2001. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1820–1826. doi:10.1046/j.0953-816X.2001.01806.x
- Lopez-Salon, M., Pasquini, L., Besio Moreno, M., Pasquini, J.M., Soto, E., 2003. Relationship between  $\beta$ -amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp. Neurol.* 180, 131–143. doi:10.1016/S0014-4886(02)00060-2
- Ma, Y.L., Tsai, M.C., Hsu, W.L., Lee, E.H.Y., 2006. SGK protein kinase facilitates the



- expression of long-term potentiation in hippocampal neurons. *Learn. Mem.* 13, 114–118. doi:10.1101/lm.179206
- Mahmoud, R.R., Sase, S., Aher, Y.D., Sase, A., Gröger, M., Mokhtar, M., Höger, H., Lubec, G., 2015. Spatial and working memory is linked to spine density and mushroom spines. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0139739
- McCann, R.F., Ross, D.A., 2017. A Fragile Balance: Dendritic Spines, Learning, and Memory. *Biol. Psychiatry* 82, e11–e13. doi:10.1016/j.biopsych.2017.05.020
- McCormick, D. a, Bal, T., 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 185–215. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.185
- Mehla, J., Lacoursiere, S.G., Lapointe, V., McNaughton, B.L., Sutherland, R.J., McDonald, R.J., Mohajerani, M.H., 2019. Age-dependent behavioral and biochemical characterization of single APP knock-in mouse (APPNL-G-F/NL-G-F) model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 75, 25–37. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.026
- Miller, D.S., Bauer, B., Hartz, A.M.S., 2008. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: Opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 60, 196–209. doi:10.1124/pr.107.07109
- Min, D., Guo, F., Zhu, S., Xu, X., Mao, X., Cao, Y., Lv, X., Gao, Q., Wang, L., Chen,

- T., Shaw, C., Hao, L., Cai, J., 2013. The alterations of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin/CaMKII/CaV1.2 signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci. Lett.* 538, 60–65. doi:10.1016/j.neulet.2013.02.001
- Mizuno, H., Nishida, E., 2001. The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes to Cells* 6, 261–268. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00418.x
- Mo, J.S., Yoon, J.H., Hong, J.A., Kim, M.Y., Ann, E.J., Ahn, J.S., Kim, S.M., Baek, H.J., Lang, F., Choi, E.J., Park, H.S., 2012. Phosphorylation of nicastrin by SGK1 leads to its degradation through lysosomal and proteasomal pathways. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0037111
- Mori, H., Kondo, J., Ihara, Y., 1987. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* (80-. ). 235, 1641–1644. doi:10.1126/science.3029875
- Mucha, M., Skrzypiec, A.E., Schiavon, E., Attwood, B.K., Kucerova, E., Pawlak, R., 2011. Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18436–18441. doi:10.1073/pnas.1107936108

- Myeku, N., Clelland, C.L., Emrani, S., Kukushkin, N. V., Yu, W.H., Goldberg, A.L., Duff, K.E., 2016. Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat. Med.* 22, 46–53. doi:10.1038/nm.4011
- Nelson, M.T., Todorovic, S.M., Perez-Reyes, E., 2006. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2189–97. doi:10.2174/138161206777585184
- Noreen, H., Yabuki, Y., Fukunaga, K., 2017. Novel spiroimidazopyridine derivative SAK3 improves methimazole-induced cognitive deficits in mice. *Neurochem. Int.* doi:10.1016/j.neuint.2017.03.001
- Oh, S., Hong, H.S., Hwang, E., Sim, H.J., Lee, W., Shin, S.J., Mook-Jung, I., 2005. Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1292–1299. doi:10.1016/j.mad.2005.07.006
- Oka, S., Leon, J., Sakumi, K., Ide, T., Kang, D., LaFerla, F.M., Nakabeppu, Y., 2016. Human mitochondrial transcriptional factor A breaks the mitochondria-mediated vicious cycle in Alzheimer’s disease. *Sci. Rep.* 6, 37889. doi:10.1038/srep37889
- Oomen, C.A., Hvoslef-Eide, M., Heath, C.J., Mar, A.C., Horner, A.E., Bussey, T.J., Saksida, L.M., 2013. The touchscreen operant platform for testing working

- memory and pattern separation in rats and mice. *Nat. Protoc.* 8, 2006–2021.  
doi:10.1038/nprot.2013.124
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., Imbimbo, B.P., 2019. A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 73–88.  
doi:10.1038/s41582-018-0116-6
- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., Chau, V., 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3033–3036. doi:10.1073/pnas.84.9.3033
- Powell, K.L., Cain, S.M., Snutch, T.P., O’Brien, T.J., 2014. Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77, 729–739. doi:10.1111/bcp.12205
- Raub, T.J., 2006. P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Mol. Pharm.* 3, 3–25. doi:10.1021/mp0500871
- Rice, R.A., Berchtold, N.C., Cotman, C.W., Green, K.N., 2014. Age-related downregulation of the CaV3.1 T-type calcium channel as a mediator of amyloid beta production. *Neurobiol. Aging* 35, 1002–1011.  
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.090
- Risher, W.C., Ustunkaya, T., Alvarado, J.S., Eroglu, C., 2014. Rapid golgi analysis

- method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. PLoS One 9.  
doi:10.1371/journal.pone.0107591
- Roebuck, A.J., Marks, W.N., Liu, M.C., Tahir, N.B., Zabder, N.K., Snutch, T.P.,  
Howland, J.G., 2018. Effects of the T-type calcium channel antagonist Z944 on  
paired associates learning and locomotor activity in rats treated with the NMDA  
receptor antagonist MK-801. Psychopharmacology (Berl). 235, 3339–3350.  
doi:10.1007/s00213-018-5040-3
- Roher, A.E., Kuo, Y.M., Esh, C., Knebel, C., Weiss, N., Kalback, W., Luehrs, D.C.,  
Childress, J.L., Beach, T.G., Weller, R.O., Kokjohn, T.A., 2003. Cortical and  
leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in  
Alzheimer's disease. Mol. Med. 9, 112–122. doi:10.1007/bf03402043
- Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N., Saido,  
T.C., 2014. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nat  
Neurosci 17, 661–663. doi:10.1038/nn.3697
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyomura, K.I., Yokosawa, H., Sawada, H., 2001. Assembly  
of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase  
subunit. Biochemistry 40, 314–319. doi:10.1021/bi001815n
- Schwartz, A.L., Ciechanover, A., 2009. Targeting Proteins for Destruction by the

- Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 73–96. doi:10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340
- Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* (80-. ). 298, 789–791. doi:10.1126/science.1074069
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L., 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- $\beta$  protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866–2875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007
- Shin, H.-S., Cheong, E.-J., Choi, S., Lee, J., Na, H.S., 2008. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels as therapeutic targets in the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 33–41. doi:10.1016/j.coph.2007.12.003
- Shioda, N., Beppu, H., Fukuda, T., Li, E., Kitajima, I., Fukunaga, K., 2011. Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J. Neurosci* 31, 346–358. doi:10.1523/JNEUROSCI.4816-10.2011
- Shioda, N., Sawai, M., Ishizuka, Y., Shirao, T., Fukunaga, K., 2015. Nuclear translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\beta$  promoted by

- protein phosphatase-1 enhances brain-derived neurotrophic factor expression in dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* 290, 21663–21675.  
doi:10.1074/jbc.M115.664920
- Smith, D.L., Pozueta, J., Gong, B., Arancio, O., Shelanski, M., 2009. Reversal of long-term dendritic spine alterations in Alzheimer disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16877–16882. doi:10.1073/pnas.0908706106
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., Bayliss, D.A., 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci.* 19, 1895–911.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K., 2000. Hybrid Proteasomes. *J. Biol. Chem.* 275, 14336–14345.  
doi:10.1074/jbc.275.19.14336
- Thibaut, T.A., Anderson, R.T., Smith, D.M., 2018. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-018-03509-0
- Townsend, M., Mehta, T., Selkoe, D.J., 2007. Soluble A $\beta$  inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33305–33312. doi:10.1074/jbc.M610390200

- Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., LaFerla, F.M., 2008. A $\beta$  inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol. Aging* 29, 1607–1618. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L.C., Warzok, R.W., 2002. Deposition of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12, 535–541. doi:10.1097/00008571-200210000-00005
- Wang, H., Saunders, A.J., 2014. The role of ubiquitin-proteasome in the metabolism of amyloid precursor protein (APP): implications for novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Discov. Med.* 18, 41–50.
- Wärntges, S., Friedrich, B., Henke, G., Duranton, C., Lang, P., Waldegger, S., Meyermann, R., Kuhl, D., Speckmann, E., Obermüller, N., Witzgall, R., Mack, A., Wagner, H., Wagner, C., Bröer, S., Lang, F., 2002. Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 443, 617–624. doi:10.1007/s00424-001-0737-1
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., Pei, K., Walker,



- D., Lue, L.F., Stanimirovic, D., Zhang, W., 2009. ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for A $\beta$  1-40 peptides. *J. Neurosci.* 29, 5463–5475.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.5103-08.2009
- Xu, J., Yabuki, Y., Yu, M., Fukunaga, K., 2018. T-type calcium channel enhancer SAK3 produces anti-depressant-like effects by promoting adult hippocampal neurogenesis in olfactory bulbectomized mice. *J. Pharmacol. Sci.* 137, 333–341.  
doi:10.1016/j.jphs.2018.07.006
- Yabuki, Y., Jing, X., Fukunaga, K., 2017a. The T-type calcium channel enhancer SAK3 inhibits neuronal death following transient brain ischemia via nicotinic acetylcholine receptor stimulation. *Neurochem. Int.* 108, 272–281.  
doi:10.1016/j.neuint.2017.04.015
- Yabuki, Y., Matsuo, K., Izumi, H., Haga, H., Yoshida, T., Wakamori, M., Kakei, A., Sakimura, K., Fukuda, T., Fukunaga, K., 2017b. Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel enhancer. *Neuropharmacology* 117, 1–13. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.011
- Yabuki, Y., Wu, L., Fukunaga, K., 2019. Cognitive enhancer ST101 improves schizophrenia-like behaviors in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats in

- association with improved CaMKII/PKC pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 140, 263–272. doi:10.1016/j.jphs.2019.07.015
- Yamamoto, Y., Shioda, N., Han, F., Moriguchi, S., Fukunaga, K., 2013. Novel cognitive enhancer ST101 enhances acetylcholine release in mouse dorsal hippocampus through T-type voltage-gated calcium channel stimulation. *J. Pharmacol. Sci.* 121, 212–226. doi:10.1254/jphs.12233FP
- Yang, E.J., Ahn, S., Ryu, J., Choi, M.S., Choi, S., Chong, Y.H., Hyun, J.W., Chang, M.J., Kim, H.S., 2015. Phloroglucinol attenuates the cognitive deficits of the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0135686
- Yang, Y.C., Ma, Y.L., Liu, W.T., Lee, E.H.Y., 2011. Laminin- $\beta$ 1 impairs spatial learning through inhibition of ERK/MAPK and SGK1 signaling. *Neuropsychopharmacology* 36, 2571–2586. doi:10.1038/npp.2011.148
- Zamponi, G.W., Lory, P., Perez-Reyes, E., 2010. Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* doi:10.1007/s00424-009-0772-x
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., 2007. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through

phosphorylation of Rpt6. *J. Biol. Chem.* 282, 22460–22471.

doi:10.1074/jbc.M702439200

Zhang, H., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Saito, T., Saido, T., Bezprozvanny,

I., 2015. Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in

Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J.*

*Neurosci.* 35, 13275–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.1034-15.2015

Zhao, D., Watson, J.B., Xie, C.W., 2004. Amyloid beta prevents activation of

calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor

phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. *J. Neurophysiol.* 92,

2853–2858.

Zhao, Y., Sivaji, S., Chiang, M.C., Ali, H., Zukowski, M., Ali, S., Kennedy, B., Sklyar,

A., Cheng, A., Guo, Z., Reed, A.K., Kodali, R., Borowski, J., Frost, G., Beukema,

P., Wills, Z.P., 2017. Amyloid Beta Peptides Block New Synapse Assembly by

Nogo Receptor-Mediated Inhibition of T-Type Calcium Channels. *Neuron* 96, 355-

372.e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.041

## 発表論文リスト

1. The Disease-modifying Drug Candidate, SAK3 Improves Cognitive Impairment and Inhibits Amyloid beta Deposition in App Knock-in Mice. Hisanao Izumi, Yasuharu Shinoda, Takashi Saito, Takaomi C.Saido, Keita Sato, Yasushi Yabuki, Yotaro Matsumoto, Yoshitomi Kanemitsu, Yoshihisa Tomioka, Nona Abolhassani, Yusaku Nakabeppu, Kohji Fukunaga. *Neuroscience*. 2018 May 1;377:87-97.